

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena  
řádná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie  
Mikrobiologie



**Bc. Nikola Pindřáková**

Charakterizace ABC-F proteinu Sco0636 u *Streptomyces coelicolor*

Characterization of the ABC-F protein Sco0636 in *Streptomyces coelicolor*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Gabriela Balíková Novotná Ph.D.

Praha, 2018

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 13. srpna 2018

Podpis

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2016 až 2018 v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky za finanční podpory GAČR 15-16225Y a GAUK 1767418.

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné Ph.D. za vedení práce, cenné připomínky a rady. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Markétě Koběrské Ph.D., a Mgr. Ludmile Veselé za neocenitelnou pomoc při realizaci této práce, a také celému kolektivu laboratoře za schovívavost a trpělivost.



## Abstrakt

Hlavním tématem této diplomové práce jsou ARE (rezistenční) proteiny z ABC-F rodiny druhé třídy ABC proteinů. ARE proteiny udílí rezistenci k antibiotikům, které se váží na velkou ribozomální podjednotku a inhibují tak proteosyntézu. Jedním z ARE proteinů je protein Lmr(C), který je součástí klastru pro biosyntézu linkomycinu u *Streptomyces lincolnensis* a dle nových výsledků se zdá, že Lmr(C) nemusí být striktně rezistenčním proteinem, ale může mít regulační funkci. Rozhodli jsme se pro studium Sco0636 nejbližšího homologu Lmr(C) u *Streptomyces coelicolor*, která je modelovým organismem při studiu sekundárního metabolismu. Díky produkci barevných pigmentů, lze sledovat vliv ARE proteinů na sekundární metabolismus přímo na plotnách. Připravila jsem deleční mutantu a kmen s konstitutivní expresí *sco0636* a sledovala jsem vliv na fenotyp. Sledovala jsem produkce modrého aktinorodinu a stanovila jsem minimální inhibiční koncentrace k vybraným antibiotikům, které působí na úrovni ribozomu.

Zjistila jsem, že Sco0636 udílí vysokou rezistenci k tiamulinu, a byl tak pojmenován jako TiaA. Delece genu zrychlila produkci aktinorodinu a konstitutivní exprese genu naopak produkci zpomalila.

**Klíčová slova:** ABC proteiny, ABC-F proteiny, Lmr(C), translace, rezistence k antibiotikům, *Streptomyces coelicolor*, aktinorodin

## **Abstract**

The main topic of this diploma thesis is ARE (resistance) proteins from the ABC-F family of the second class of ABC proteins. ARE proteins confer resistance to antibiotics that bind to a large ribosomal subunit and therefore inhibit proteosynthesis. One of the ARE proteins is the Lmr (C) protein, which is part of the linkomycin biosynthesis cluster of *Streptomyces lincolnensis*, and according to new results, Lmr (C) does not have to be just resistant protein but may have also regulatory function. We decided to study Sco0636, the closest homologue to Lmr (C) in *Streptomyces coelicolor*, which is a model organism in the study of secondary metabolism. Thanks to the production of color pigments, it is possible to monitor the effect of ARE proteins on secondary metabolism directly on the plates. I prepared the deletion mutant and the strain with constitutive expression of sco0636, and observed the effect on the phenotype. I followed the production of a blue asset and set a minimum inhibitory concentration to selected antibiotics, which bind to the ribosome.

I have found that Sco0636 gives high resistance to tiamulin and so it has been named TiaA. The deletion of gene sco0636 accelerated production of actinorhodine, and constitutive expression of this gene slowed down production.

**Keywords:** ABC proteins, ABC-F proteins, Lmr (C), translation, resistance to antibiotics, *Streptomyces coelicolor*, actinorhodine

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>ABC PROTEINY</b>	<b>13</b>
2.1	STRUKTURA ABC PROTEINŮ	13
2.2	KLASIFIKACE ABC PROTEINŮ	15
2.2.1	ABC-F proteiny	18
<b>3</b>	<b>BAKTERIÁLNÍ TRANSLACE</b>	<b>22</b>
3.1	STRUKTURA RIBOZOMU	22
3.2	TRANSLACE	23
<b>4</b>	<b>INHIBITORY TRANSLACE / ANTIBIOTIKA INHIBUJÍCÍ PROTEOSYNTÉZU</b>	<b>26</b>
4.1	MAKROLIDY	26
4.2	LINKOSAMIDY	27
4.3	FENOLY	27
4.4	STREPTOGRAMINY	27
4.5	OXAZOLIDINONY	28
4.6	PLEUROMUTILINY	28
<b>5</b>	<b>STREPTOMYCES COELICOLOR</b>	<b>30</b>
5.1	AKTINORODIN	31
5.2	UNDECYLPRODIGIOSIN	32
<b>6</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>34</b>
6.1	MATERIÁL	34
6.1.1	Bakteriální kmeny	34
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	34
6.1.2	Vektory	35
6.1.3	Primery	35
6.1.4	Kultivační média	36
6.1.5	Enzymy	37
6.1.6	Roztoky	38
6.1.7	Chemikálie	39
6.1.8	Antibiotika	39
6.1.9	Počítačová analýza	40
6.2	METODY	40
6.2.1	Kultivace <i>Escherichia coli</i> a <i>Streptomyces coelicolor</i>	40
6.2.2	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci tepelným šokem	41
6.2.3	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci elektroporací	41
6.2.4	Příprava spor	42
6.2.5	Transformace tepelným šokem	42
6.2.6	Transformace elektroporací	42
6.2.7	Mezidruhovú konjugace	43
6.2.8	Izolace plazmidové DNA	44
6.2.9	Izolace chromozomální DNA	44
6.2.10	Polymerázová řetězová reakce	45
6.2.11	DNA elektroforéza	46
6.2.12	Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu	46
6.2.13	Restrikční štěpení DNA	47
6.2.14	Ligační reakce	47
6.2.15	Sekvenční analýza DNA	48

6.2.16	<i>Fylogenetická analýza</i> .....	48
6.2.17	<i>PCR targeting – metoda inaktivace genů</i> .....	48
6.2.18	<i>Stanovení minimální inhibiční koncentrace</i> .....	50
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>52</b>
7.1	KOMPARATIVNÍ ANALÝZA ABC-F PROTEINŮ .....	52
7.2	PŘÍPRAVA DELEČNÍ MUTANTY <i>SCO0636</i> .....	54
7.3	PŘÍPRAVA KONSTRUKTU PRO KONSTITUTIVNÍ EXPRESI <i>SCO0636</i> .....	59
7.4	STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE .....	62
7.5	SLEDOVÁNÍ PRODUKCE AKTINORODINU .....	64
7.5.1	<i>Testování vlivu ABC-F proteinu Sco0636 a Lmr(C) na produkci aktinorodinu</i> .....	64
7.5.2	<i>Testování vlivu subinhibiční koncentrace antibiotika na produkci aktinorodinu</i> .....	65
7.5.3	<i>Testování produkce aktinorodinu na plotnách s antibiotickými disky</i> .....	67
<b>8</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>SOUHRN</b> .....	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>74</b>

## Seznam použitých zkratek

ABC proteiny	ATP-binding cassette proteins	ATP-vazebné proteiny
ARE proteiny	antibiotic resistance proteins	
ART	antibiotic resistance and translation regulation	
CLI	clindamycin	klindamycin
CMN	chloramphenicol	chloramfenikol
dH <sub>2</sub> O	distilled water	destilovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxide	dimethylsulfoxid
ECF systémy	energy coupling factor	
EttA	energy-dependent translational throttle protein	
ERY	erythromycin	erytromycin
KAN	kanamycin	kanamycin
LIN	lincomycin	linkomycin
MIC	minimal inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	
NBD	nucleotide binding domain	nukleotid vazebná doména
OD	optical density	optická denzita
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
oriT	origin of transfer	počátek konjugace
PIA	pristinamycin IA	pristinamycin IA
PIIA	pristinamycin IIA	pristinamycin IIA
PTC	peptidyl transferase center	peptidyltransferázové centrum
REG	regulation of gene expression	

RLI	RNasa L inhibitor	
RPM	revolutions <b>per minute</b>	počet otáček za minutu
RT	room <b>teperature</b>	pokojová teplota
SBP proteiny	hight-affinity solute-binding proteins	
TIA	tiamulin	tiamulin
TET	tetracycline	tetracyklin
TMD	<b>trans</b> membrane <b>d</b> omain	transmembránová doména
UVR	DNA repair and drug resistance	
UV záření	<b>ultra violet</b> light	ultrafialové záření
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i>	
	vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i>	
VRSA	vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	
	vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	



# 1 Úvod

Antibiotika se od svého objevu staly velkým přínosem pro medicínu díky své schopnosti inhibovat růst bakteriální populace. Zajistily možnost léčby řady infekčních onemocnění do chvíle, kdy se začaly objevovat a šířit rezistentní patogeny. V přírodě se vyskytuje několik producentů antibiotik např. rod *Streptomyces* a biologická funkce antibiotik u těchto organismů není zřejmě jen inhibiční. Mohou být využity i jako signální molekuly, a navíc v závislosti na své koncentraci, mohou fungovat jako aktivátory nebo represory genů. Mikroorganismy si tak díky své značné metabolické diverzitě dokáží vytvořit ochranné mechanismy, které jim poskytnou ochranu před působením antibiotik. Mikroflóra přirozeného prostředí má tedy určité rezistenční geny, které jsou podobné těm u patogenních organismů. A pokud se na antibiotika podíváme s větším odstupem zjistíme, že mohou fungovat jako další způsob komunikace. Tato signalizace může vést k fenotypové a genové adaptaci (Aminov 2009).

Důležitou roli ve vztahu k antibiotikům hrají ABC-F proteiny, které patří mezi ABC (ATP-binding cassette) transportéry. Ty jsou rozděleny do 3 tříd a pro tuto diplomovou práci je nejdůležitější třída 2. Proteiny této třídy jsou specifické tím, že ve své struktuře mají pouze nukleotid vazebnou doménu a mohou být rozděleny na regulační a rezistenční. Mezi regulační patří nejlépe charakterizovaný protein translační faktor EttA, který reguluje proteosyntézu na základě poměru ATP a ADP v buňce (Boël *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014). ARE (Antibiotic resistance proteins) proteiny se nacházejí u patogenních organismů a u producentů antibiotik. U patogenů jako ochrana před působením antibiotik a u producentů jako ochrana před vlastními produkty. U producentů antibiotik se nacházejí samostatně nebo jako součást biosyntetických klastrů (Méndez & Salas, 2001). Studium těchto proteinů se zabývá i naše laboratoř. Zajímá se jednak o ARE proteiny u patogenních organismů např. VgaA nebo MsrA u *Staphylococcus aureus*, a také o ARE proteiny, které se vyskytují u producentů antibiotik. Konkrétním příkladem je protein Lmr(C), který je součástí biosyntetického shluku *Streptomyces lincolnensis* producenta linkomycinu. Tato diplomová práce se tedy zabývá studiem ABC-F proteinu Sco0636 u *Streptomyces coelicolor* nejbližším homologem Lmr(C).

## Cíle diplomové práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo charakterizovat gen *sco0636* u *Streptomyces coelicolor* M145, jenž je nejbližším homologem genu *lmr(C)* z linkomycínového biosyntetického klastru u *Streptomyces lincolnensis*.

### Jednotlivé kroky vedoucí k vytyčenému cíli:

- Připravit deleční mutantu genu *sco0636* u *Streptomyces coelicolor* M145
- Připravit konstrukt pro konstitutivní expresi genu *sco0636*
- Zjistit vliv delece genu *sco0636* a konstitutivní exprese genu *sco0636* na fenotyp *Streptomyces coelicolor* M145 a *Streptomyces coelicolor* M1154 stanovením minimální inhibiční koncentrace a sledováním vlivu na produkci aktinorodinu



## 2 ABC proteiny

Pro všechny formy života je velmi podstatný transport anorganických i organických látek přes buněčnou membránu. Primární transport proti chemickému gradientu, který vyžaduje energii získanou nejčastěji hydrolýzou ATP a sekundární transport po chemickém gradientu bez účasti energie.

ABC proteiny z anglického **ATP-binding cassette**, jsou velká skupina proteinů, které se účastní transportu látek za spotřeby energie získané hydrolýzou ATP na ADP. Tyto proteiny jsou schopny přenášet velké spektrum látek, od malých anorganických molekul (např. aminokyseliny, sacharidy, vitamíny) až po velké organické molekuly jako jsou např. peptidy, lipidy, polysacharidy (Licht & Schneider 2011, Wilkens 2015). Nicméně ne všechny ABC proteiny se účastní transportu látek. Některé se podílí na netransportních procesech, jako jsou např. reparace DNA a translace proteinů (Licht & Schneider 2011).

U prokaryot mohou ABC proteiny udělovat rezistenci k antibiotikům, mohou být zodpovědné za sekreci virulenčních faktorů a mohou zprostředkovávat příjem nejrůznějších živin (Davidson *et al.*, 2008). Mnoho ABC proteinů je také medicínsky významných. Jejich dysfunkce je u člověka spojována s řadou onemocnění např. Cystická fibróza, Tangierova choroba a Stargardtova nemoc (Borst & Elferink 2002, Molday *et al.*, 2009 Silverton *et al.*, 2011).

### 2.1 Struktura ABC proteinů

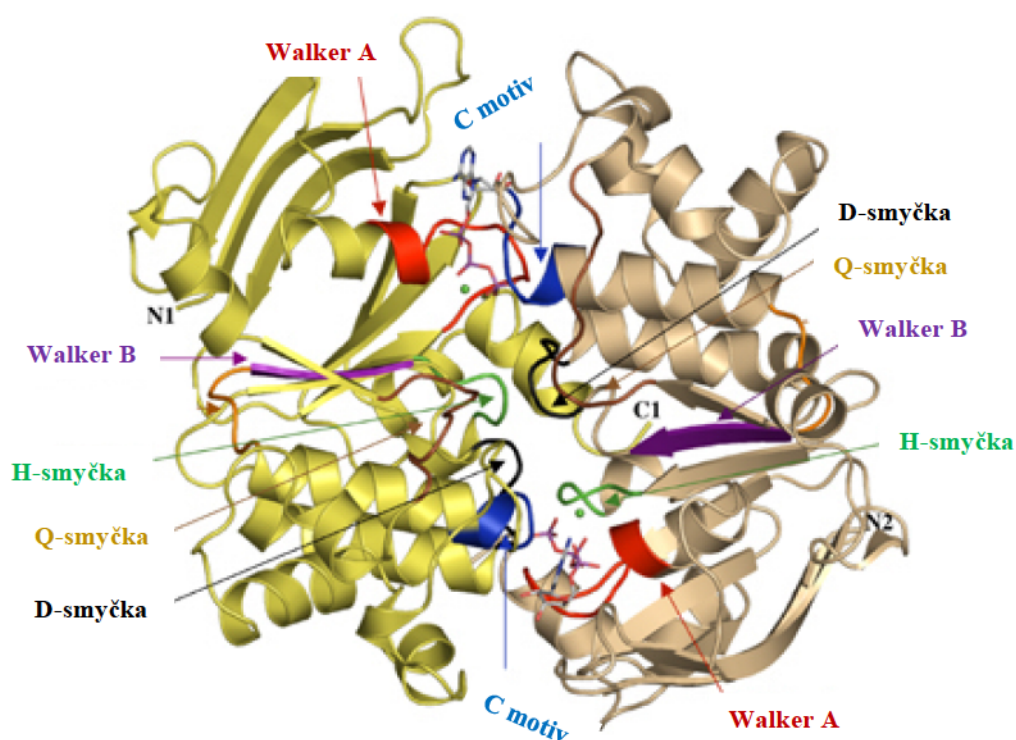
Většina ABC proteinů je organizována ve čtyřech funkčních jednotkách, dvou transmembránových (TMD) a dvou nukleotid vazebných doménách (NBD). Tyto domény mohou být v organismu v nejrůznějších kombinacích (Holland & Blight 1999, Licht & Schneider 2011). Tyto hlavní domény mohou být doplněny o pomocnou podjednotku, která je zodpovědná za zachycení transportovaného substrátu a jeho přenos na místo vazby v TMD. U gram-negativních bakterií se tyto podjednotky nachází v periplazmě a u gram-pozitivních tvořeny lipoproteiny a jsou ukotvené k plazmatické membráně (Wilkens 2015).

TMD je tvořena 6 až 10  $\alpha$ -helixy, které tvoří transmembránový pór. Funkcí TMD je tak transport nejrůznějších substrátů. Sekvence TMD není významně konzervovaná, ale sdílí podobnou topologii v třídě transportérů (Wilkens 2015).

Naopak NBD je vysoce konzervovaná jak ve své struktuře, tak i v sekvenci, což ji činí charakteristickým znakem pro ABC proteiny (Wilkens 2015). Tato doména váže a hydrolyzuje molekuly ATP. Každá NBD je tvořena jádrem, které má 200 aminokyselin a skládá se z větší RecA-like domény a menší  $\alpha$ -helikální subdomény, která je jedinečná pro ABC proteiny. Na NBD lze rozlišit sedm konzervovaných motivů (Obr. 1).

A-smyčka s konzervovaným aromatickým zbytkem, kterým je většinou tyrosin, napomáhá umístění ATP (Beek *et al.*, 2014). P-smyčka nebo také Walker A motiv s charakteristickou sekvencí GXXGXGK S/T váže fosfát a obsahuje vysoce konzervovaný lyzinový zbytek. Třetím motivem je Walker B motiv, který napomáhá koordinaci hořčnatých iontů přes aspartátový zbytek. Druhý kyselý zbytek, který se nachází na konci tohoto motivu, je obecná báze a polarizuje zvenčí působící molekuly vody. Sekvence Walker B motivu je  $\phi \phi \phi$ DE ( $\phi$  = hydrofobní aminokyselina). Dalším motivem je D-smyčka označovaná také jako SALD motiv. Konformační změny této smyčky pomáhají vytvářet místo pro hydrolyzu ATP. Další je H-smyčka, která má vysoce konzervovaný histidinový zbytek. Tato smyčka napomáhá při lokalizaci obecné báze, iontů hořčíku a zvenčí působících molekul vody (Davidson *et al.*, 2008, Beek *et al.*, 2014). Předposlední je Q-smyčka. Ta je umístěna mezi RecA-like a  $\alpha$ -helikální subdoménou a je hlavním místem spojení s TMD (Oswald *et al.*, 2006, Davidson *et al.*, 2008, Beek *et al.*, 2014). Posledním vysoce konzervovaným motivem je C motiv nebo jinak LSGGQ motiv. Je lokalizován v  $\alpha$ -helikální subdoméně a je charakteristický pro ABC proteiny (Davidson *et al.*, 2008, Beek *et al.*, 2014).

Dvě NBD vůči sobě mohou zaujímat dvě konformační postavení: otevřené, kdy jsou zčásti disociované a uzavřené, kdy se těsně uzavírají a dochází k hydrolyze ATP. Na jejich rozhraní se nachází dvě ATP vazebná místa. Při navázání ATP se zaujímá uzavřená konformace, dojde k hydrolyze ATP, uvolní se fosfát, ADP a dimer si destabilizuje. Obě NBD se začnou od sebe oddalovat a subdomény RecA-like a  $\alpha$ -helikální každé z NBD se začnou navzájem otáčet. Chemická energie z ATP se přeměňuje na konformační a je předávána na TMD pro transport substrát (Beek *et al.*, 2014).



Obrázek 1: Struktura nukleotid vazebné domény ABC transportérů (převzato a upraveno Hanekop *et al.*, 2006)

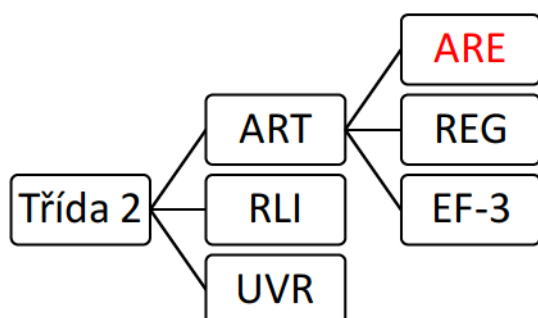
## 2.2 Klasifikace ABC proteinů

Pro vytvoření klasifikace byla využita vysoce konzervovaná NBD. Na základě porovnání podobnosti NBD a také transportní funkce byly ABC proteiny rozděleny do tří tříd, jak znázorňuje Obr. 3 (Davidson *et al.*, 2008).

Proteiny třídy 1 mají jak TMD, tak i NBD a obě domény sedí na jednom polypeptidovém řetězci. Funkce této třídy je export látek, jejichž spektrum je značně široké do velikosti a do chemické struktury. Exportují lipidy, proteiny, peptidy, steroly, antibiotika, proteiny buněčné stěny, a dokonce malé molekuly léčiv (Davidson *et al.*, 2008).

Třída 2 zahrnuje proteiny, které nemají TMD a podílejí se na netransportních procesech, jako je např. reparace poškozené DNA a rezistence k antibiotikům. Tento fakt poukazuje, že substrátová specifita je vázaná na NBD a pomocné podjednotky (Licht & Schneider, 2011). Tato třída se člení do tří rodin viz obr. 2 (Dassa *et al.*, 2001). Rodina UVR má svou roli při opravě DNA a při udílení rezistence. Proteiny RLI rodiny se nachází u eukaryot, u archeí a jejich funkce je iniciace translace a biogeneze ribozomů (Davidson *et al.*, 2008). Poslední rodinou jsou ART proteiny. Tato rodina je pro mou diplomovou práci nejzajímavější, především pak jedna ze tří podrodin, do kterých se ART rodina rozděluje. Konkrétně je to podrodina ARE, která uděluje rezistenci k antibiotikům (Dassa *et al.*, 2001,

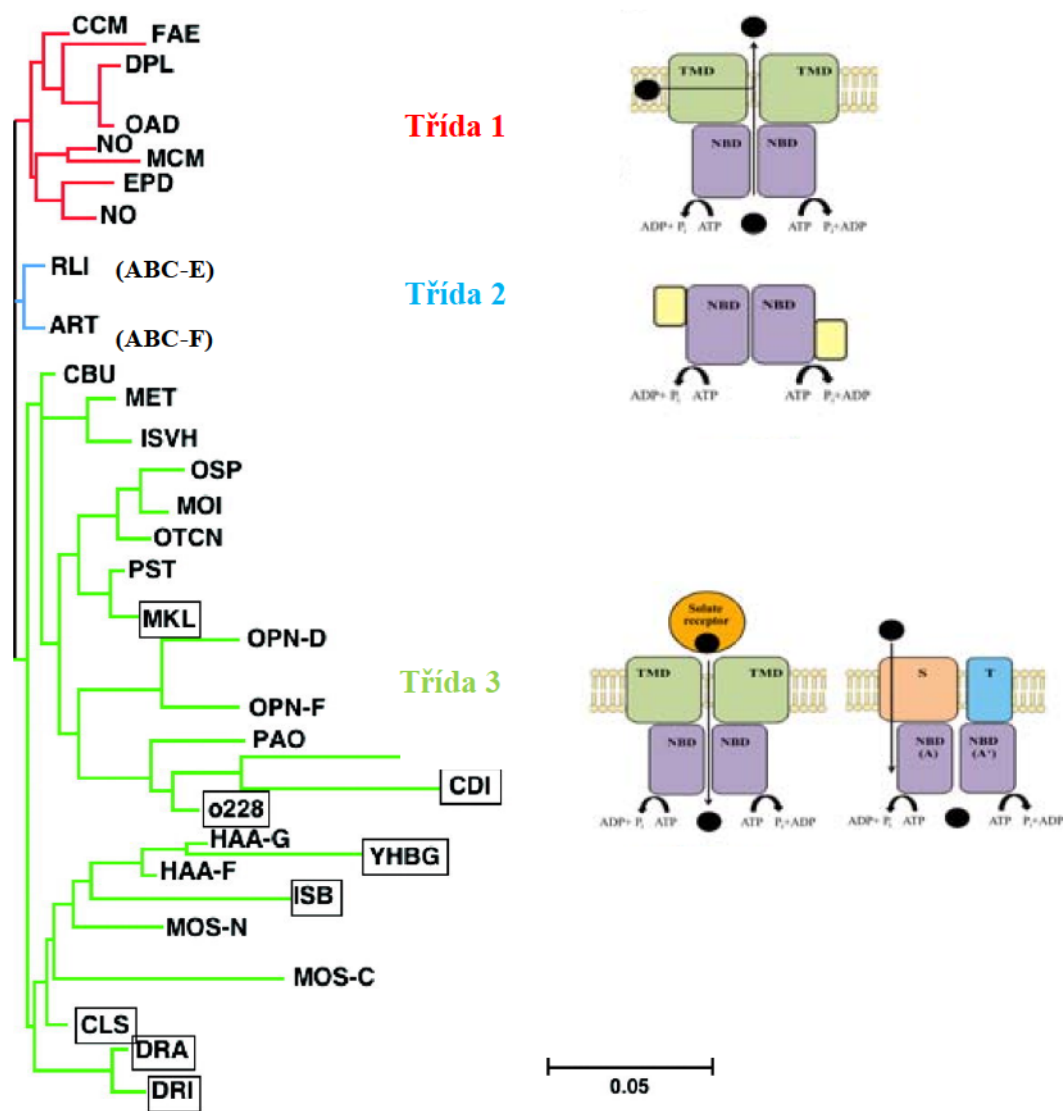
Davidson *et al.*, 2008). Další podrodina je EF-3 podílející se na elongaci translace a REG podrodina s regulační funkcí (Davidson *et al.*, 2008).



Obrázek 2: Rozdělení třídy 2 ABC transportérů

Třída 3 obsahuje především proteiny transportující látky do buňky a část proteinů zodpovědné za export. Tyto proteiny mají NBD a TMD tvořenou odděleným polypeptidovým řetězcem. Typickou strukturou pro tuto třídu je tzv. EAA motiv, který tvoří rozhraní mezi TMD a NBD. Tato „spojka“ interaguje s Q-smyčkou a umožňuje spojení hydrolýzy ATP na NBD a konformačních změn na TMD (Licht & Schneider, 2011). Třída 3 se rozděluje na typ I – kanonické importéry a typ II – ECF systémy (energy coupling factor) (Licht & Schneider, 2011, Beek *et al.*, 2014). Funkce importéru typ I je závislá na SBP proteinech (high-affinity solute-binding protein). ECF importéry zprostředkovávají transport vitamínů, jejích prekurzorů a některých kovů (Licht & Schneider, 2011).



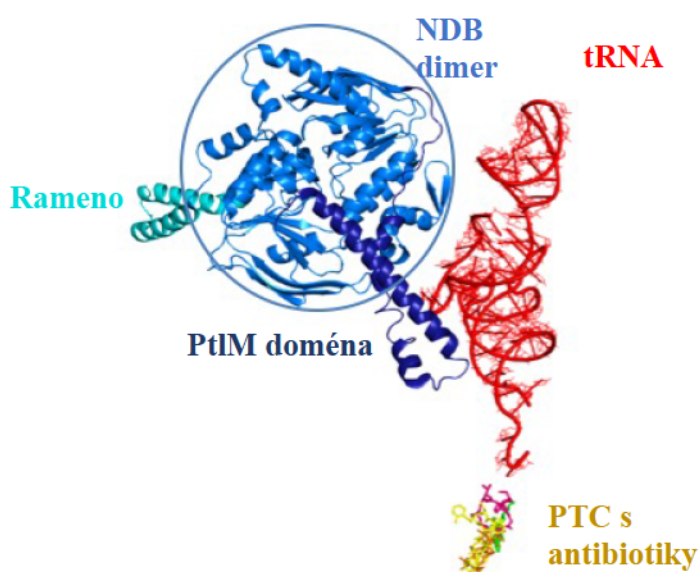


Obrázek 3: Fylogenetický strom klasifikace ABC transportérů (převzato a upraveno Davidson *et al.*, 2008, Licht & Schneider 2011) Třída 1 a 3 ve své struktuře obsahují transmembránovou doménu a nukleotid vazebnou doménu. Třída 2 má jen nukleotid vazebnou doménu a případně pomocnou doménu (žlutě označená ve struktuře třídy 2).

### 2.2.1 ABC-F proteiny

Obecná struktura těchto proteinů je tvořena N terminální ABC1 nukleotid vazebnou doménou, která nese subdoménu zvanou rameno. Následuje úsek linker, který připojuje druhou doménu ABC2. Rameno a linker mají málo konzervativní primární strukturu, ale jsou si výrazně podobné ve složení. Jsou bohaté na nabitě aminokyseliny, především na arginin a lysin. Během evoluce u nich mohlo dojít k jistým modifikacím např. zkrácení nebo prodloužení jejich délky (Murina *et al.*, 2017). ABC-F proteiny nemají ve své struktuře TMD, neúčastní transportu a mohou být rozděleny do dvou skupin: regulační a rezistenční.

Nejznámějším a nejlépe charakterizovaným regulačním ABC-F proteinem je translační faktor EttA (Energy-dependent translational throttle protein). Reguluje proteosyntézu na základě energetického stavu buňky. EttA zabráňuje progresi 70S iniciačního komplexu, váže se do E místa a interaguje s aminoacylovou stopkou tRNA<sup>Met</sup> navázanou v P místě (Chen *et al.*, 2014, Lenart *et al.*, 2015). Reguluje elongaci translačního cyklu v závislosti na změnách poměru intracelulárního ATP a ADP. Při dostatku ATP EttA podporuje tvorbu peptidické vazby, naopak při nedostatku tvorbu vazby inhibuje. Po hydrolýze ATP je pravděpodobně ribozomu umožněn vstup do elongační fáze (Boël *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014). Ve struktuře faktoru EttA rozlišujeme dva významné motivy (Obr. 4). Prvním motivem je prodloužená struktura PtlM doména (linker), která umožňuje interakce se stopkou tRNA<sup>Met</sup> a zasahuje do peptidyltransferázového centra (PTC). Druhým motivem je rameno, které omezuje činnost ribozomu podle dostupnosti ATP (Lenart *et al.*, 2015).



Obrázek 4: Struktura proteinu EttA a její interakce s tRNA a peptidyltransferázovým centrem (převzato a upraveno Lenart *et al.*, 2015)

Druhou skupinu tvoří ARE proteiny udílející rezistenci vůči antibiotikům, které se váží na 50S ribozomální podjednotku. Mezi tyto antibiotika patří makrolidy, likosamidy, pleuromutiliny, fenoly, ketolidy, oxazolidinony a streptograminy (Dassa *et al.*, 2001, Davidson *et al.*, 2008).

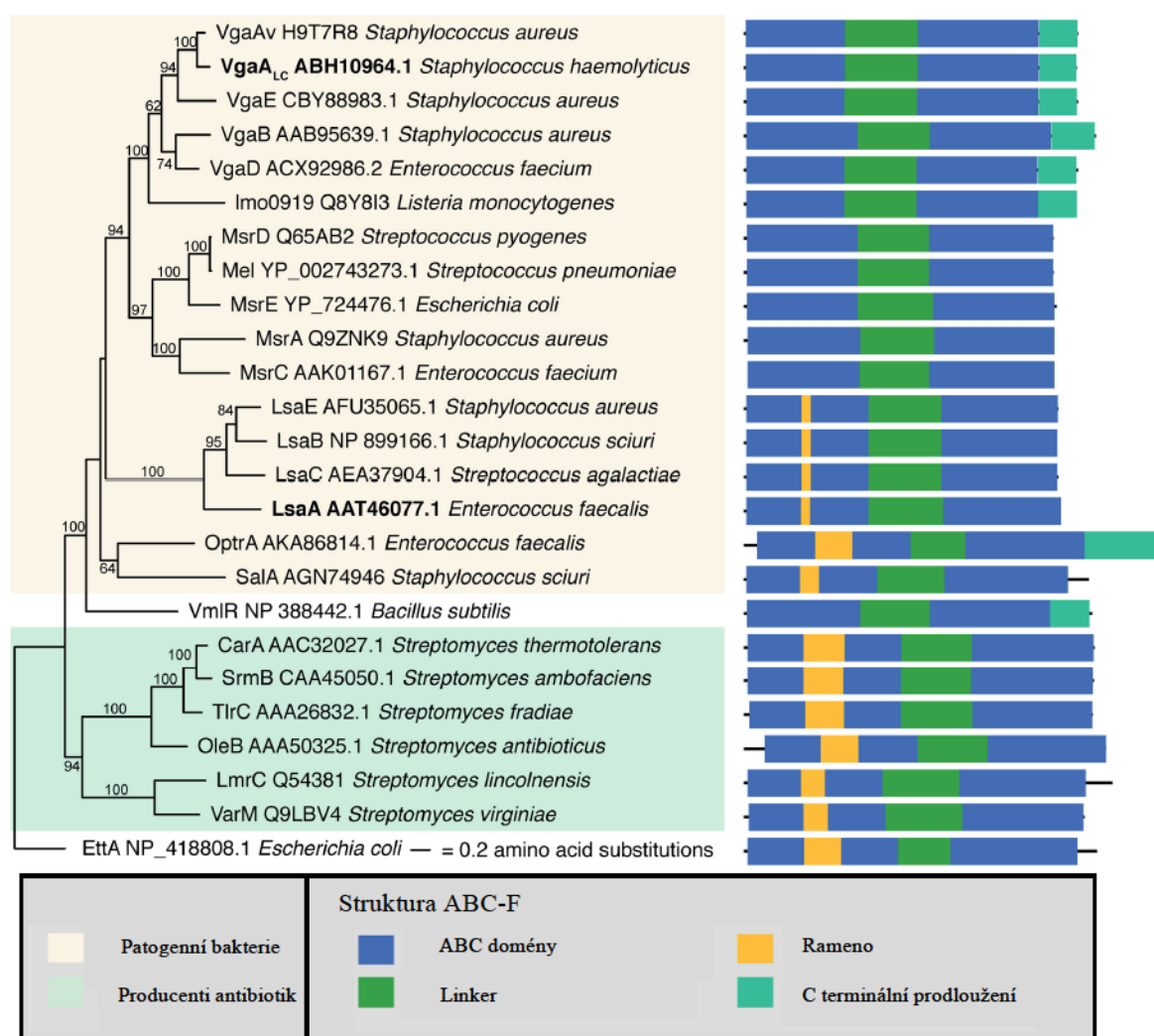
Mechanismus účinku ARE proteinů byl po dlouhou dobu vysvětlován pomocí dvou hypotéz. První hypotéza říká, že se ABC proteiny spojí s doposud nezjištěnou TMD a vytvoří efluxní komplex pro transport antibiotika ven z buňky. Druhá hypotéza poukazuje na to, že ARE proteiny snižují přístupnost nebo afinitu vazebného místa pro antibiotikum na 50S podjednotce a chrání tak ribozom. Podle výsledků studie byla *in vitro* potvrzena hypotéza o ochraně ribozomu (Sharkey *et al.*, 2016).

ARE proteiny se nacházejí jak u patogenních bakterií např. u rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*, tak u producentů antibiotik. Patogenní mikroorganismy ARE proteiny využívají pro rezistenci vůči působení antibiotik (Méndez & Salas, 2001). Jeden ARE proteinu, ale neudílí rezistenci proti všem jmenovaným skupinám antibiotik. Existují tak tři fenotypy kombinované rezistence: linkosamidy, pleuromutiliny a streptograminy skupiny A, makrolidy a streptograminy skupiny B, fenoly a oxazolidinony. Příkladem je protein Msr(A) u *Staphylococcus epidermidis*, který je zodpovědný za rezistenci vůči erytromycinu (makrolidy) a streptograminu B (Reynolds & Cove 2005, Tessé *et al.*, 2013, Hot *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2015). Ve struktuře ARE proteinů u patogenních organismů má linker variabilní délku a jeho aminokyselinové složení udává specifitu rezistence k antibiotikům (Lenart *et al.*, 2015). Úsek označovaný jako rameno je buď velmi krátký, nebo chybí úplně (Murina *et al.*, 2017).

ARE proteiny u producentů antibiotik, např. rod *Streptomyces* (Tab. 1), se nachází buď samostatně nebo jako součást shluku pro biosyntézu antibiotik. Jejich struktura je trochu odlišná od ARE proteinů u patogenů. Doména linker je kratší, ale naopak doména rameno je delší (Murina *et al.*, 2017). Rozdílnost délky domén rameno a linker u patogenů a producentů je znázorněna na obr. 5.

Producent	Antibiotikum	ABC-F protein
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomycin	LmrC
<i>Streptomyces virginiae</i>	Virginiamycin	VarM, VarL
<i>Streptomyces rochei</i>	Lankacinin, lankamycin	LkcJ, LkcI, LkcN
<i>Streptomyces thermotolerans</i>	Karbomycin	CarA
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiramycin	SrmB
<i>Streptomyces fradiae</i>	Tylosin	TlrC
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomycin	OleB

Tabulka 1: Producenti antibiotik z rodu *Streptomyces*



Obrázek 5: Srovnání struktury ARE proteinů u patogenních bakterií a producentů antibiotik. Zobrazeno také srovnání variability délky linkeru a ramene u patogenů a producentů (převzato a upraveno Murina *et al.*, 2018)



Příkladem ARE proteinů od producentů je protein Lmr(C) u *Streptomyces lincolnensis* producenta linkomycinu (Zhang *et al.*, 1992). Gen kódující protein Lmr(C) je součástí shluku pro biosyntézu linkomycinu (Obr. 6) společně s dalšími dvěma rezistenčními geny: *lmr(A)* a *lmr(B)*. Gen *lmr(A)* kóduje protein z rodiny MFS (major facilitator superfamily) transportérů a zodpovídá za transport nově nasyntetizovaného antibiotika ven z buňky. Gen *lmr(B)* kóduje 23S rRNA methyltransferázu, která udává rezistenci k makrolidům, linkosamidům, streptograminům B a brání vazbě antibiotika na ribozom metylací specifického adeninu A2058 na 23S rRNA (Zhang *et al.*, 1992).



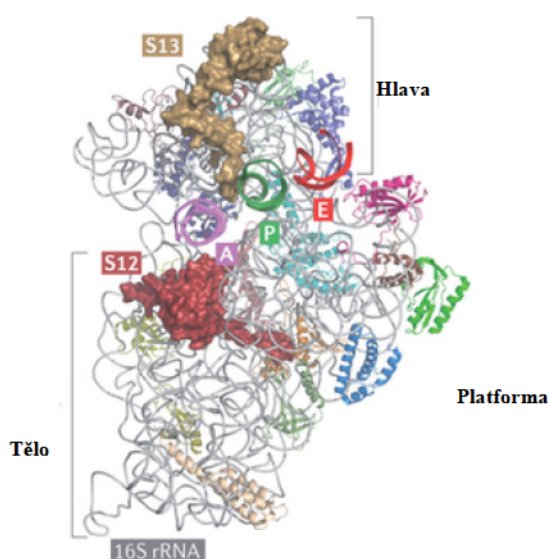
Obrázek 6: Genový klastr biosyntézy linkomycinu (převzato a upraveno Koběřská *et al.*, 2008)

### 3 Bakteriální translace

#### 3.1 Struktura ribozomu

Ribozom je buněčná organela, která se skládá ze dvou podjednotek, a to malé 30S a velké 50S, každá se svou funkcí. Pro správnou funkci celého ribozomu je potřeba, aby obě podjednotky byly ve spojení. Dvě třetiny ribozomu tvoří ribozomální RNA a zbylou jednu třetinu ribozomální proteiny (Steitz & Moore, 2003).

Malou podjednotku, 30S podjednotku podle relativní sedimentační rychlosti, tvoří 16S RNA a 21 proteinů (Wimberly *et al.*, 2000, Laursen *et al.*, 2005). Váže mRNA, antikodonovou tRNA a její zásadní role spočívá v dekodování mRNA dohlížením na párování bází mezi kodonem na mRNA a antikodonem na tRNA (Green & Noller 1997). Sekundární struktury RNA malé podjednotky lze rozdělit do tří domén (Obr. 7). První doména je tvořena 5' koncem rRNA a je také nazývána jako tělo. Druhá doména je tvořena centrální částí 16S RNA a tvoří platformu. Poslední doména je tvořena 3' koncem rRNA a tvoří formaci zvanou hlava (Stagg *et al.*, 2003).

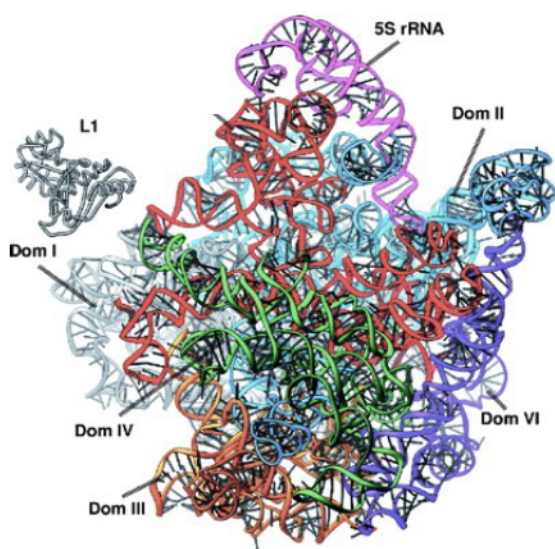


Obrázek 7: Struktura malé ribozomální podjednotky (převzato a upraveno Yamamoto *et al.*, 2013)

Velká 50S ribozomální podjednotka je tvořena 23S RNA, 5S RNA a 34 proteiny (Laursen *et al.*, 2005). Tato podjednotka katalyzuje tvorbu peptidické vazby. Architekturu velké podjednotky tvoří šest domén, které mají komplikovaně uspořádanou strukturu (Obr. 8). Doména I svou strukturou připomíná houbu a leží v zadní části velké podjednotky ribozomu. Doména II je největší z domén, tvoří většinu zadní strany podjednotky a má tři výčnělky.

Doména III tvoří levou dolní část podjednotky a interaguje s ostatními doménami: doménou I, II, IV a VI. S doménou II má nejsilnější kontakt, zatímco s doménou V jen slabý. Doména IV tvoří většinu povrchu rozhraní velké podjednotky, které interaguje s malou podjednotkou. Doména V se nachází ve středu podjednotky, mezi doménou II a IV. Doména VI je nejmenší doménou a připomíná písmeno X (Ban *et al.*, 2000).

Nejzajímavější částí této domény je tzv. Sarcin-ricinová smyčka, která je důležitá pro aktivitu ribozomu. Na tuto smyčku cílí cytotoxiny jako je  $\alpha$ -sarcin a ricin. Činností těchto cytotoxinů dojde k úplnému přerušení translace (Szewczak & Moore 1995, Shi *et al.*, 2011).



Obrázek 8: Struktura velké ribozomální podjednotky (převzato a upraveno Ban *et al.*, 2000)

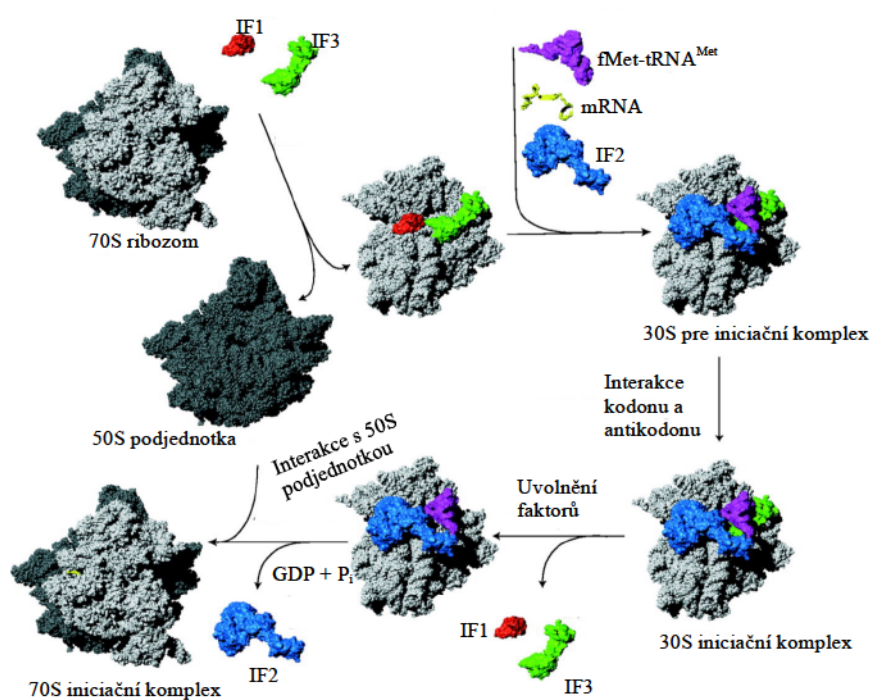
Na ribozomu ještě rozlišujeme 3 vazebná místa důležitá pro proteosyntézu. Prvním je místo A, na které se váže tRNA nesoucí odpovídající aminokyselinu kodonu na mRNA (Spirin 2002). Druhým je P místo určené pro molekulu tRNA nesoucí narůstající peptidický řetězec, který odchází z ribozomu v místě zvaném exit tunel. Vazba nových aminokyselin do narůstajícího peptidického řetězce probíhá v peptidyltransferázovém centru (PTC) (Ban *et al.*, 2000, Spirin 2002). Poslední je místo E pro deacylovanou tRNA, která je tudy uvolňována z ribozomu (Spirin 2002, Sergeiv *et al.*, 2005).

## 3.2 Translace

Translace je komplexní a vícestupňový proces, při kterém dochází k překladi mRNA do aminokyselinové sekvence proteinů. Tento proces probíhá na ribozomech a je odlišný u prokaryotních a eukaryotních organismů. Odlišnost je daná tím, že translace u prokaryot

probíhá současně s transkripcí. Na jednom konci probíhá transkripce do mRNA a na druhém, již volném konci mRNA, dochází k translaci. U translace eukaryot napřed vzniká pre-mRNA, která je posttranskripčně upravována do podoby definitivní mRNA. Poté je transportována z jádra do cytoplazmy, kde dochází k translaci na ribosomech. Průběh proteosyntézy má tři fáze: iniciaci, elongaci a terminaci.

První fází je iniciace, která začíná ve chvíli, kdy se iniciátorová tRNA (N-formylmethionyl-tRNA,  $fMet-tRNA_i^{Met}$ ) naváže do P místa na 30S ribozomální podjednotku. Současně se váží iniciační faktory IF1, IF2, IF3 a mRNA, což vede k vytvoření pre-iniciačního komplexu. IF1 se váže do A místa a směřuje  $fMet-tRNA_i^{Met}$  na P místo (Laursen *et al.*, 2005, Kaczanowska & Rydén-Aulin 2007, Vigar & Wieden 2017). IF2 hydrolyzuje GTP na GDP a fosfát, stimuluje spojení 50S a 30S podjednotky. IF3 stabilizuje vazbu  $fMet-tRNA_i^{Met}$  na ribozom v P místě. Ke správné lokalizaci mRNA při vazbě na ribozom, přispívá Shine-Dalgarnova sekvence (SD sekvence) nacházející se před start kodonem a nasedající na anti-SD sekvenci (Yusupova *et al.*, 2001, Laursen *et al.*, 2005, Kaczanowska & Rydén-Aulin 2007, Vigar & Wieden 2017). Poté antikodon  $fMet-tRNA_i^{Met}$  rozpozná start kodon mRNA AUG nebo GUG a dojde k zformování stabilního iniciačního komplexu. Na něj nasedá 50S podjednotka a dochází k vytvoření 70S iniciačního komplexu (Obr.9), který je připraven pro vstup do druhé fáze translace – elongace (Laursen *et al.*, 2005).

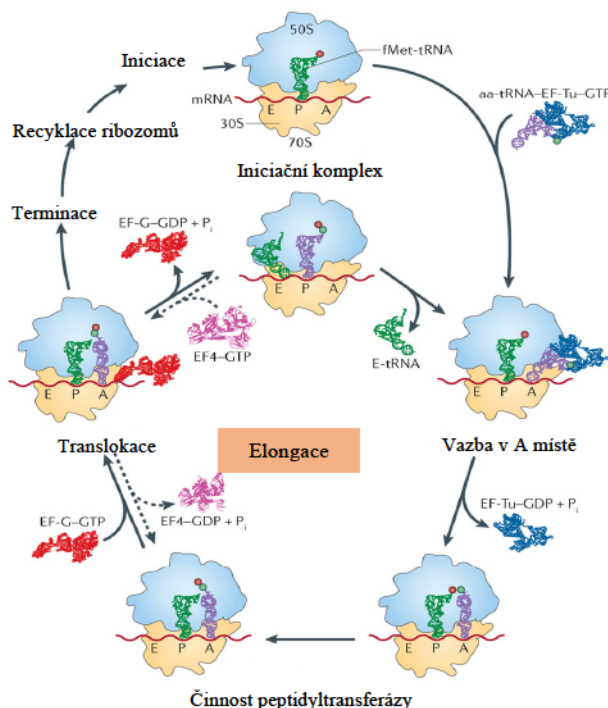


Obrázek 9: Tvorba 70S iniciačního komplexu (převzato a upraveno Laursen *et al.*, 2005)



V elongační fázi dochází k prodlužování syntetizovaného peptidu postupným přidáváním aminokyseliny do řetězce. Odpovídající aminokyselina je vybrána podle sekvence nukleotidů mRNA. V místě P je navázána fMet-tRNA<sup>Met</sup> a do místa A se váží aminoacyl tRNA, které jsou do ribozomu přinášeny společně s elongačním faktorem EF-Tu a GTP. Při správném dekódování a výběru aminokyseliny dojde k hydrolýze GTP a elongační faktor se uvolní. Narůstající peptidický řetězec se posune z tRNA v místě P na nově příchozí aminoacyl tRNA v A místě a řetězec se tak prodlouží o jednu aminokyselinu za účasti peptidyltransferázy, enzymu katalyzující vznik peptidické vazby. Deacylovaná tRNA z místa P se posouvá do místa E, aby mohla být z ribozomu uvolněna. tRNA s narůstajícím peptidem se přemístí z A do P místa. A místo se tak uvolní pro novou aminoacyl tRNA a translace se opakuje. Během translokace na ribozomu dochází k posunu mRNA vždy o 3 nukleotidy (Laursen *et al.*, 2005, Kaczanowska & Rydén-Aulin 2007).

V momenty, kde se na místo A dostane sekvence mRNA odpovídající stop kodonu, dojde k ukončení translace. Stop kodon je rozpoznán terminačními faktory RF1 a RF2. RF1 rozpoznává stop kodony UAA a UAG, RF2 UAA a AGA. Při navázání terminačních faktorů na ribozom dojde k hydrolýze esterové vazby mezi tRNA v místě P a narůstajícím peptidem (Kissellev *et al.*, 2003). Rozvolní se iniciační komplex a ribozom je recyklován pro další translaci (Kiel *et al.*, 2003). Celý translační cyklus zobrazuje obr.10.



Obrázek 10: Translační cyklus (převzato a upraveno Yamamoto *et al.*, 2013)

## 4 Inhibitory translace / antibiotika inhibující proteosyntézu

Antibiotika jsou látky, které zabíjí bakterii nebo alespoň inhibují jejich množení a podle mechanismu působení je rozdělujeme do několika skupin: antibiotika inhibující syntézu peptidoglykanu, poškozující buněčnou stěnu, inhibující syntézu nukleonových kyselin, inhibující proteosyntézu, inhibující různé metabolické dráhy (Votava 2005, Julák 2009). Ve své diplomové práci se zabývám studiem ARE proteinů, které udílejí rezistenci vůči antibiotikům působících na úrovni ribozomů. Pro další popis byla vybrána pouze antibiotika, která se váží na 50S ribozomální podjednotku.

### 4.1 Makrolidy

Makrolidy ve své struktuře obsahují 14členný, 15členný nebo 16členný makrolidový kruh a jsou rozděleny do tří generací. První generace je zastoupena erytromycinem A produkovaný *Saccharopolyspora erythraea*. Účinný je erytromycinu proti gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus species*), gram-negativním bakteriím (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) a intracelulárním patogenům (*Chlamydia species*, *Mycoplasma species*, *Legionella species*). Do druhé generace patří semisyntetické deriváty erytromycinu jako jsou claritromycin, azitromycin a roxitromycin. Tato generace má lepší farmakodynamiku a širší mikrobiální spektrum působení (Kannan & Mankin 2011). Třetí generace je zastoupena ketolidy, které jsou spojovány s baktericidní účinkem.

Makrolidy jsou bakteriostatická antibiotika, která se v klinické praxi používají při léčbě respiračních infekcí, jako jsou pneumonie, tonsilitidy a při léčbě urogenitálních infekcí. Nejsou vhodná pro léčbu těžkých infekcí, septických stavů nebo nozokomiálních infekcí. Jsou netoxická a lze je podávat dětem, těhotným a kojícím ženám. Jako vedlejší účinky mohou způsobovat gastrointestinální obtíže (Beneš 2018).

Makrolidy se váží na 50S ribozomální podjednotku v exit tunelu do blízkosti PTC (Obr. 11). Brání průchodu nově vznikajícího peptidického řetězce a narušují elongaci translace (Kannan & Mankin 2011). 14členné a 15členné makrolidy brání průchodu až ve chvíli, kdy se narůstající peptid dotkne místa vazby antibiotika. Zatímco 16členné makrolidy inhibují translaci dřív, díky vedlejším řetězcům nesoucí disacharidy (Poulsen *et al.*, 2000).

## 4.2 Linkosamidy

Tato skupina antibiotik je poměrně malá, přirozeně se vyskytující zástupci jsou pouze linkomycin a celesticetin produkované *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces caelestis*. Ze semisyntetických derivátů v klinické praxi našel uplatnění jen klindamycin, který se vyrábí chlorací linkomycinu. Struktura linkomycinu je tvořená cukernou a aminokyselinovou jednotkou, které jsou spojené amidovou vazbou (Spížek & Řezanka 2016).

Linkosamidy mají odlišnou strukturu od makrolidů, ale podobný mechanismus účinku. Také se váží na 50S ribozomální podjednotku blízko PTC (Obr. 11). Narušují standardní průběh proteosyntézy, přerušují načasování a specifčnost jednotlivých kroků translace, interagují s A a P místem na ribozomu. Linkomycin a klindamycin jsou velmi účinné proti stafylokokovým a streptokokovým infekcím (Spížek & Řezanka 2016). Klindamycin je navíc ještě účinný proti některým anaerobům a byl použit při léčbě malárie a toxoplazmózy (Lell & Kremsner 2002).

## 4.3 Fenoly

Nejznámějším zástupcem této skupiny je chloramfenikol. Je produkován *Streptomyces venezuelae* (Chater 2006) a je to širokospektré antibiotikum. Působí na velkou řadu gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, včetně anaerobů (Wiest *et al.*, 2012). Má bakteriostatické až baktericidní účinky a do klinické praxe byl zaveden v roce 1947. Byl používán při léčbě tyfu a běžně používán v klinické i veterinární praxi. V 70. letech byly prokázány nebezpečné vedlejší účinky např. aplastická anémie, poškození kostní dřeně, a tak bylo jeho používání výrazně omezeno (Hanekamp & Bast 2014). Chleramfenikol blokuje peptidyltransferázu a brání vazbě tRNA do místa A na ribozomu (Hansen *et al.*, 2003).

## 4.4 Streptograminy

Tato skupina antibiotik je taktéž produkována rodem *Streptomyces*, ale i jinými rody např. *Actinoplanes* nebo *Micromonospora* (Mast & Wohlleben 2014). Je rozdělená do dvou typů: streptograminy A (S<sub>A</sub>) a streptograminy B (S<sub>B</sub>). S<sub>A</sub> mají strukturu tvořenou cyklickými peptidy a mezi jejich zástupce patří např. pristinamycin IIA a dalfopristin. S<sub>B</sub> jsou tvořeny cyklickými hexadepsi-peptidy a mezi jejich zástupce řadíme např. pristinamycin IA nebo quinupristin (Johnston *et al.*, 2002, Mast & Wohlleben 2014). Pristinamycin a jeho deriváty jsou využívány pro léčbu infekcí vyvolaných gram-pozitivními bakteriemi včetně



multirezistentních, jako jsou MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), VRSA (vancomycine-resistant *Staphylococcus aureus*) a VRE (vancomycine-resistant *Enterococcus faecium*). Také je účinný proti gram-negativním bakteriím *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, a proti původcům atypických pneumonií jako je např. *Legionella pneumophila*. Při používání streptograminů samostatně jsou jejich účinky bakteriostatické, ale v případě kombinace streptograminů dojde k synergnímu účinku a antibiotika působí baktericidně. Zástupcem této kombinace je semisyntetický derivát s názvem Synercid, složený z dalfopristinu a quinupristinu. Tento přípravek se používá při léčbě závažných a život ohrožujících infekčních stavech vyvolaných VRE a při léčbě těžkých infekcí kůže způsobených původci *Staphylococcus aureus* a streptokoky skupiny A (Mast & Wohlleben 2014, Singh *et al.*, 2014).

Oba typy streptograminů se váží na velkou ribozomální podjednotku. S<sub>A</sub> se váží do těsné blízkosti PTC, blokují A a P místo, brání tvorbě peptidické vazby a narůstání peptidického řetězce. Naopak S<sub>B</sub> cílí na přerušení elongace po několika opakováních vazbou na 23S RNA a blokují exit tunelu, podobně jako makrolidy (Mast & Wohlleben 2014).

## 4.5 Oxazolidinony

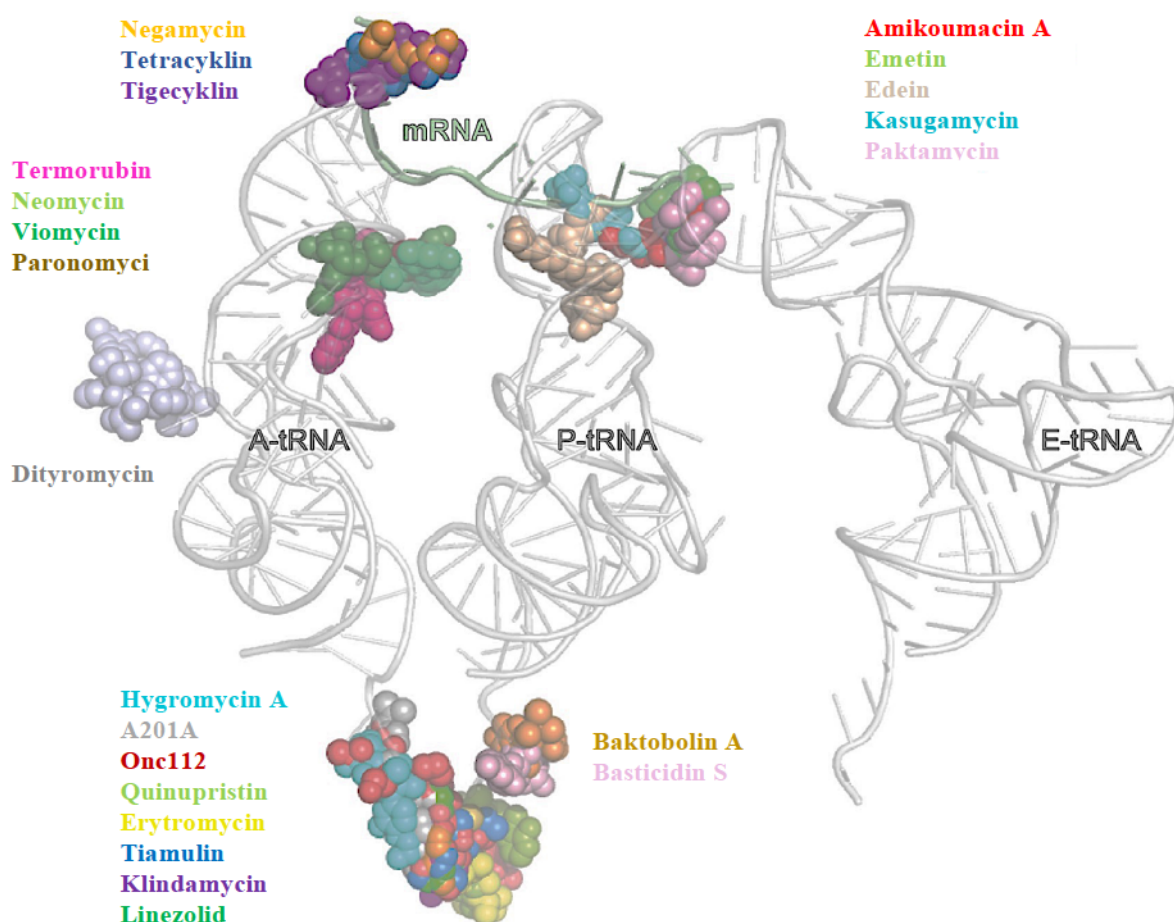
Syntetickým zástupcem této skupiny je linezolid, který se používá proti multirezistentním původcům jako jsou např. MRSA a VRE. Není však vhodný proti gram-negativním bakteriím (Chien *et al.*, 2000). Linezolid se váže do A místa na 50S podjednotce (Obr. 11), ovlivňuje vazbu nebo umístění iniciátorové tRNA a zabraňuje translaci (Wilson *et al.*, 2008).

## 4.6 Pleuromutiliny

Pleuromutiliny jsou produkovány houbou *Pleurotus mutilus* (*Clitopilus scyphoides*). Mezi zástupce těchto antibiotik patří tiamulin a valnemulin, které se používají ve veterinární praxi při léčbě mykoplazmat (Islam *et al.*, 2009). Dalším derivátem je retapamulin, který byl vytvořen pro klasickou klinickou praxi. Retapamulin má bakteriostatický účinek a používá se pro léčbu kožních infekcí vyvolaných *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Působí také proti *Streptococcus agalactiae*,  $\beta$ -hemolytickým streptokokům, koaguláza negativním stafylokokům a některým gram-negativním původcům (Parish & Parish 2008). Pleuromutiliny se váží na 50S ribozomální podjednotku do P místa (Obr. 11), což vede k jeho



blokaci. Inhibují PTC a brání tvorbě aktivních 50S podjednotek (Poulsen *et al.*, 2001, Yan *et al.*, 2006). Struktura pleuromutilinu je tvořená tricyklickým mutilinovým jádrem s keto skupinou na pozici C21, která je podstatná pro antibakteriální účinky (Davidovich *et al.*, 2007).



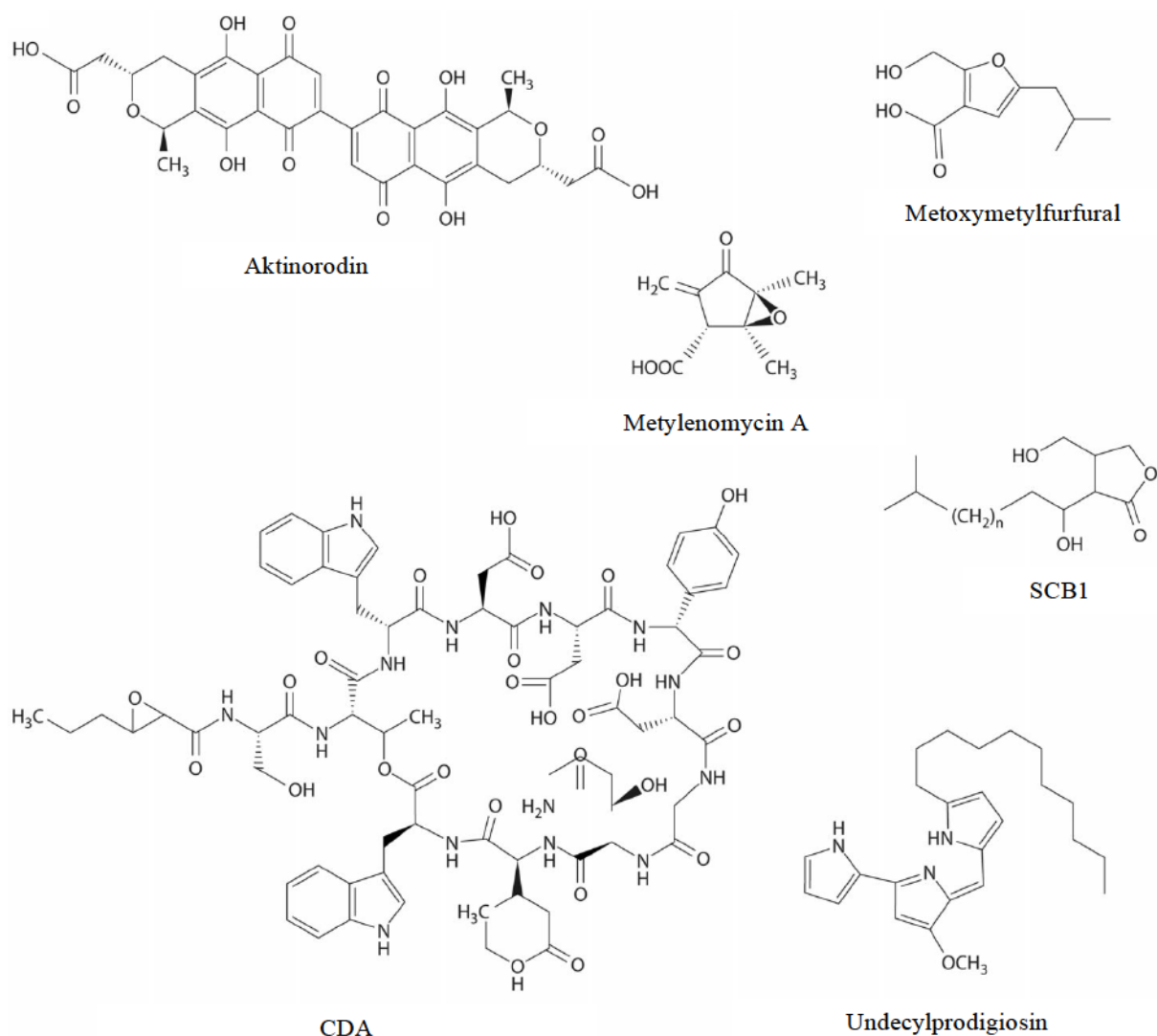
Obrázek 11: Souhrnné zobrazení vazby antibiotik do vazebných míst na ribozomu (převzato a upraveno Arenz & Wilson 2016)

## 5 *Streptomyces coelicolor*

Rod *Streptomyces* patří mezi *Actinobacteria* a jsou to aerobní, gram-pozitivní vláknité, sporující půdní bakterie (Flärdh & Buttner 2009). Jejich životní cyklus je značně komplikovaný a zahrnuje tvorbu mladého mycelia, vegetativního mycelia, vzdušných hyf a spor (Li *et al.*, 2014). Mají velký klinický význam díky produkci sekundárních metabolitů (Obr. 12): antiparazitických, imunosupresivních, protinádorových a antibakteriálních látek (Ohnishi *et al.*, 2008). Díky svému klinickému významu a své značné schopnosti diferenciaci buněk je rod *Streptomyces* hojně využíván při studiu produkce sekundárních metabolitů a mnohobuněčné diferenciaci (Ohnishi *et al.*, 2008).

Nejlépe prostudovaným zástupcem tohoto rodu je *Streptomyces coelicolor*. Má lineární chromozomální DNA o velikosti 8,7 Mb s vysokým obsahem G+C (70 %). V jejím genomu se nachází více než 7 800 potenciálních genů a více než 20 genových shluků (Bentley *et al.*, 2002). Stejně jako jiné z rodu *Streptomyces*, produkuje několik antibiotik a další sekundárních metabolitů. Díky produkci barevných pigmentů, které odpovídají určité růstové fázi se *Streptomyces coelicolor* stala modelovým organismem pro studium sekundárních metabolitů (Bentley *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2013).

Produkce antibiotik podléhá složité regulaci, do které se zapojuje řada faktorů z okolního prostředí např. některé kovy, pH, koncentrace živin (Rønnest *et al.*, 2011). Tato regulace je tvořena řadou genů, které jsou v biosyntetických klastrech a regulují množství produkované látky. Tyto regulační geny jsou specifické pro produkci určité látky a mohou mít vliv na globální transkripční schéma (Huang *et al.* 2005). Obecně lze říci, že produkce sekundárních metabolitů je zahájena, když změny prostředí nebo hladovění ukončí rychlý vegetativní růst a ovlivní globální exprese genů (Nieselt *et al.*, 2010).



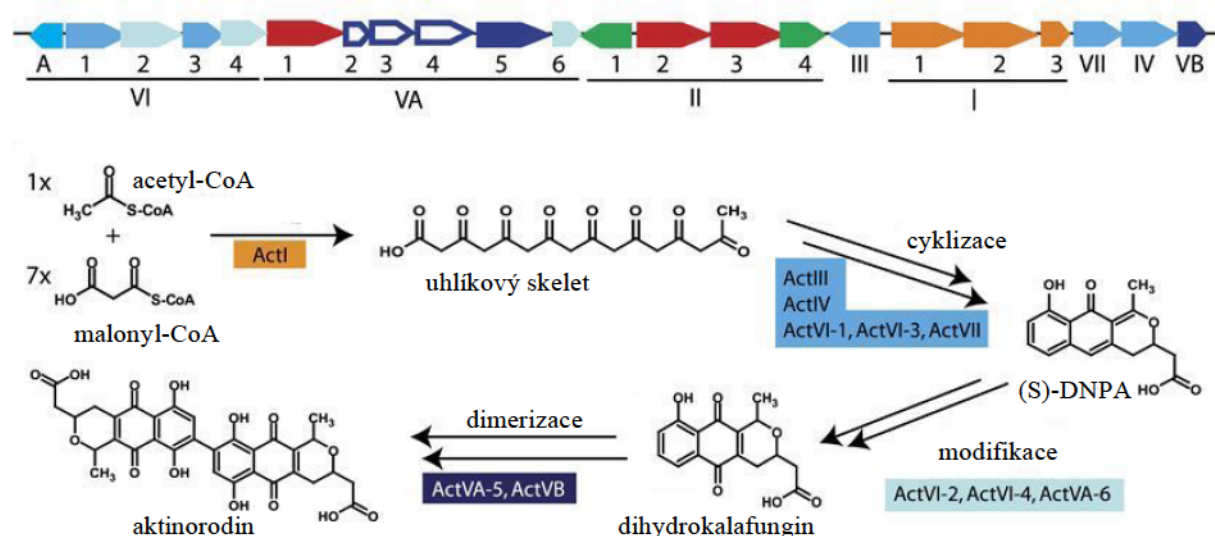
Obrázek 12: Příklady sekundárních metabolitů produkované *Streptomyces coelicolor* (upraveno a převzato Liu *et al.*, 2013). Antibiotika: aktinorodin, CDA (Calcium-dependent antibiotic), undecylprodigiosin, metylenomycin A  
Autoregulátory: SCB1, metoxymetylfurfural

## 5.1 Aktinorodin

Aktinorodin je modře zbarvené antibiotikum, které inhibuje růst gram-pozitivních bakterií (Zhang *et al.*, 2006). Patří do skupiny aromatických polyketidů a benzoisochromanchinonů. Své uplatnění nachází i jako pH indikátor, v kyselém prostředí je červený a v alkalickém modrý (Abass & Edwards 1990).

Při syntéze (Obr. 13) buňka využívá prekursorů mastných kyselin primárního metabolismu pro vytvoření uhlíkového skeletu. Ten se cyklizuje za vzniku 3 kruhových meziproduktů, které se modifikují a dimerizují na finální aktinorodin (Craney *et al.*, 2013).

Genový klastř pro syntézu aktinorodinu je tvořen pěti transkripčními jednotkami, které podléhají aktivátoru ActII-ORF4 (Liu *et al.*, 2013, Craney *et al.*, 2013). Exprese aktivátoru je ovlivňována globálními regulátory, které fungují jako aktivátory nebo represory (Craney *et al.*, 2013). Promotorová oblast aktivátoru je cílem asi osmi regulačních proteinů např. regulátor produkce a vývoje antibiotika AdpA (Ohnishi *et al.*, 2005), globální regulátor poškození DNA LexA (Iqbal *et al.*, 2012), anebo ActR represor z TetR rodiny. Jejich C-koncová vazebná doména interaguje s molekulami, které zachycují protein v konformaci, kdy neváže DNA, čímž dojde k aktivaci promotoru (Ramos *et al.*, 2005, Tahlan *et al.*, 2007, Reichheld *et al.*, 2009).



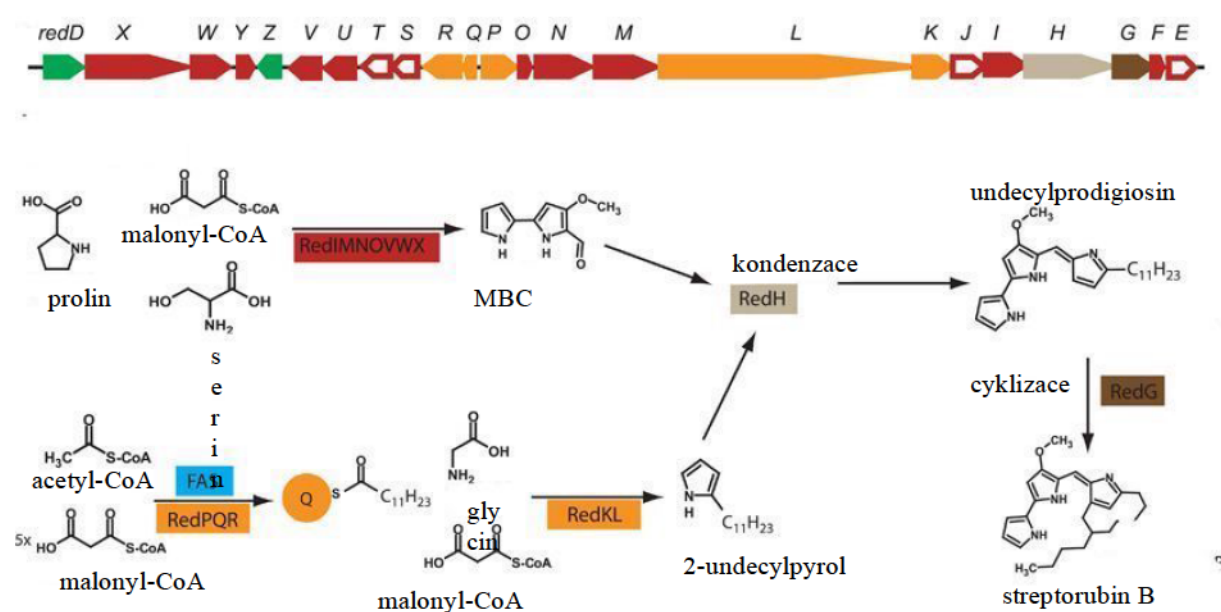
Obrázek 13: Genový klastř a biosyntéza aktinorodinu (převzato a upraveno Craney *et al.*, 2013)

## 5.2 Undecylprodigiosin

Jiným názvem prodigiosin C-25 je pyrolový pigment, který má tmavě červenou barvu (Stankovič *et al.*, 2012). Tento pigment má antibakteriální, antimalarické, imunosupresivní a cytotoxické účinky (Perez-Tomas *et al.*, 2003, Williamson *et al.*, 2007). Undecylprodigiosin poskytuje ochranu před UV zářením a je výhodný při kompetici s jinými mikroorganismy (Staric *et al.*, 2010, Boric *et al.*, 2011).

Pro syntézu undecylprodigiosinu (Obr. 14) se využívá kombinace dvou cest, syntéza z mastných kyselin a druhá speciální nemodulární neribozomální syntéza (Cerdeno *et al.*, 2001). Během syntézy dochází ke vzniku dvou specifických prekurzorů, a to 4-metoxy-2,2-bipyrol-5-karboxaldehyd (MBC) a 2-undecylpyrol (Williamson *et al.*, 2006).

Geny pro syntézu tohoto pigmentu jsou uloženy v klastru o velikosti 30 kb a jsou regulovány dvěma geny: *redZ* a *redD* (Craney *et al.*, 2013). Gen *redZ* je přímý aktivátor *redD*, který je aktivátorem genů pro biosyntézu undecylprodigiosinu (White & Bibb, 1997). In vitro bylo navíc poukázáno, že biosyntézu lze modifikovat přidáním undecylprodigiosinu a inhibovat vazbu *redZ* na *redD* (Wang *et al.*, 2009).



Obrázek 14: Genový klast a biosyntéza undecylprodigiosinu (převzato a upraveno Craney *et al.*, 2013)



## 6 Materiál a metody

### 6.1 Materiál

#### 6.1.1 Bakteriální kmeny

##### *Escherichia coli*

##### **XL-1 blue**

Komerčně zakoupený kmen od Agilent Technologies. Tento kmen byl použit pro klonování a namnožení plazmidů.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacI<sup>f</sup>*  $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

##### **BW25113/pIJ790**

Kmen *Escherichia coli* BW25113 obsahuje plazmid pIJ790, který nese rezistenční marker (rezistence vůči chloramfenikolu) a teplotně citlivý replikační počátek. Teplota potřebná k jeho replikaci je 30 °C (Gust *et al.*, 2003). Do kmene byl transformován kosmid 7G01 nesoucí gen *sco0636*, který byl inaktivován. Buňky získány od autora protokolu PCR-targeting (Gust *et al.*, 2003).

##### **ET12567/pUZ8002**

*Escherichia coli* ET12567 je nemetylující kmen (*dam* mutace) obsahující RP4 derivát pUZ8002. Plazmid pUZ8002 umožňuje přenos DNA. Nese kanamycinovou rezistenci pro udržení plazmidu a chloramfeniklovou rezistenci pro udržení *dam* mutace (Gust *et al.*, 2003). Tento kmen byl použit pro mezidruhovou konjugaci připraveného kosmidu 7G01 s inaktivační kazetou 773 nahrazující gen *sco0636*, prázdného vektoru pIJ10257 a vektoru pIJ10257 s vloženým genem *sco0636* pod konstitutivním promotorem.

Genotyp: *dam-13::Tn9 dcm-6 hsdS* Cm<sup>R</sup>

##### *Streptomyces coelicolor*

##### **M145**

Tento kmen byl vytvořen z *Streptomyces coelicolor* A3(2) odstraněním plazmidu SCP1 a SCP2.

## **M1154**

Od kmene *Streptomyces coelicolor* M145 byl odvozen kmen *Streptomyces coelicolor* M1154, a to delecí čtyř genových klastrů pro biosyntézu sekundárních metabolitů a vytvořením bodových mutací genů *rpoB* a *rpsL*. Schopnost tvořit spory je u tohoto kmene horší než u původního kmene (Gomez-Excribano & Bibb 2011).

Genotyp:  $\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda$  *rpoB* [C1298T] *rpsL*[A262G]

### **6.1.2 Vektory**

#### **pIJ773**

Tento plazmid nese inaktivační kazetu 773, která udílí rezistenci k apramycinu a byla využita při inaktivaci genu *sco0636*. Velikost tohoto plazmidu je 4,33 kb (Gust *et al.*, 2003) a byl získán z John Innes Center, Norwich, Velká Británie.

#### **pIJ10257**

Pro vytvoření tohoto vektoru byl přidán konstitutivní promotor *ermE*\* do plazmidu pMS81 (Hong *et al.*, 2005). Velikost tohoto plazmidu je 6,61 kb a má hygromycinovou rezistenci. Byl získán University of Cambridge a byl využit pro přípravu konstruktů pro konstitutivní expresi genu *sco0636*.

#### **Kosmid 7G01**

Kosmid 7G01 byl vytvořen z pWEB<sup>TM</sup> a nese úsek z genomu (*sco0001* – *sco7846*) *Streptomyces coelicolor* včetně genu *sco0636* (Fernández-Martínez *et al.*, 2011). Tento kosmid byl využit pro inaktivaci genu *sco0636* metodou PCR-targeting. Byl získán od Streptomyces cosmid library, Earlham Institute, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UZ UK.

### **6.1.3 Primery**

Primerů byla objednáno u společnosti Sigma-Aldrich. Pro naředění byla využita sterilní destilovaná voda a použité primery jsou uvedeny v tab. 2.

Název primeru	Sekvence	Použití	Autor
Sco0636FW	CTGTTCTCTGCCCCTCACTGCCACGAGGTC GTCTTCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Amplifikace rezistenční kazety 773 a okolí genu <i>sco0636</i>	N. Pindřáková
Sco0636Rev	GACACCATGGCACCCGGGAGGTCCGCCGC CGACGGCCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC		N. Pindřáková
Kazeta773for	ATGGGCCACTTGGACTGAT	Ověření inserce rezistenční kazety 773 v deleční mutantě	M. Koběrská
Testovací delece 0636	GACCGCGGTGAGCTGCGCTTCC	Ověření delece genu <i>sco0636</i> v deleční mutantě	N. Pindřáková
Testovací 0636R	GCACCCCCCGACCGCAAACG	Ověření inserce rezistenční kazety 773 a delece <i>sco0636</i>	N. Pindřáková
Sco0636pIJFW	TCCTCATATGTCCGACGCCGCTGTC	Amplifikace genu <i>sco0636</i> pro inserci genu do plazmidu pIJ10257	N. Pindřáková
Sco0636pIJRev	ATATCTCGAGCTACTCCTCCGGCGCC		N. Pindřáková
TestpIJ10257f wnew	TTGAAAAACGCTCACTGGTAC	Ověření inserce genu <i>sco0636</i> do plazmidu pIJ10257, sekvenace	L. Veselá
TestpIJ10257 Rnew	CGAGCTGAAGAAAGACAATC		

Tabulka 2: Přehled použitých primerů

#### 6.1.4 Kultivační média

Připravovaná media a pevné půdy byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C 15 minut. U LB agaru, LB média a SOC média bylo pH upraveno na 7,5 a u YEME produkční, 2xYT na pH 7,2. MS agar byl 2x klávován a byla použita kohoutková voda. U SOC média byly MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> a glukóza přidány až po klávování. Pro klávování médií použit autokláv značky Tuttanauer model 2540E.



LB médium		LB agar	
Trypton	10 g/dm <sup>3</sup>	Trypton	10 g/dm <sup>3</sup>
Kvasnicový extrakt	5 g/dm <sup>3</sup>	NaCl	5 g/dm <sup>3</sup>
NaCl	5 g/dm <sup>3</sup>	Glukóza	1 g/dm <sup>3</sup>
Glukóza	1 g/dm <sup>3</sup>	Agar	10 g/dm <sup>3</sup>
SOC médium		Médium pro uchování buněk	
Trypton	2 %	Polyetylenglykol	15 mM
Kvasnicový extrakt	0,5 %	Glycerol	36 %
NaCl	10 mM	MgSO <sub>4</sub>	12 mM
KCl	2,5 mM		
Glukóza	20 mM		
DNA agar		2 x YT médium	
Difco Nutrien Agar	23 g/dm <sup>3</sup>	Trypton	16 g/dm <sup>3</sup>
		Kvasnicový extrakt	10 g/dm <sup>3</sup>
		NaCl	5 g/dm <sup>3</sup>
MS agar		MH agar	
Agar	20 g/dm <sup>3</sup>	Muller-Hinton broth	21 g/dm <sup>3</sup>
Sojová mouka	20 g/dm <sup>3</sup>	Agar	15 g/dm <sup>3</sup>
Manitol	20 g/dm <sup>3</sup>		
YEME produkční		2xYT	
Kvasničný extrakt	4 g/dm <sup>3</sup>	Trypton	16 g/dm <sup>3</sup>
Pepton	5 g/dm <sup>3</sup>	Kvasničný extrakt	10 g/dm <sup>3</sup>
Sladový extrakt	10 g/dm <sup>3</sup>	NaCl	5 g/dm <sup>3</sup>

### 6.1.5 Enzymy

#### Restrikční endonukleázy

Během této diplomové práce bylo použito několik restrikčních endonukleáz. Všechny tyto enzymy byly pořízeny od firmy New England BioLabs. V tab. 3 jsou uvedeny použité enzymy a jejich reakční podmínky.

	Restrikční místo	Inkubační teplota	Reakční pufr	Inaktivace
HindIII - HF	AAGCTT	37 °C	1x Cutsmart	80 °C 20 minut
BamHI - HF	GGATCC	37 °C	1x Cutsmart	-
XhoI	CTCGAG	37 °C	1x Cutsmart	65 °C 20 minut
EcoRI	GAATTC	37 °C	1x Cutsmart	65 °C 20 minut

Tabulka 3: Přehled použitých restrikčních endonukleáz

### DNA ligáza

Tato ligáza (Tab. 4) byly použita při přívapě konstruktů pro konstitutivní expresi genu *sco0636*. Ligáza i ligační pufr byly zakoupeny od firmy New England BioLabs.

Ligáza	Reakční pufr
T4 DNA ligáza	T4 DNA ligační pufr s 10 mM ATP

Tabulka 4: DNA ligáza

### DNA polymerázy

V tab. 5 jsou uvedeny použité DNA polymerázy. Polymeráza Phusion® High-Fidelity od firmy New England BioLabs má menší chybovost. Byla využita pro amplifikaci inaktivační kazety 773 a genu *sco0636* pro přípravu konstruktů pro konstitutivní expresi. Zbylé polymerázy od firmy Top-Bio.

Polymeráza	Reakční pufr
LA DNA polymeráza	1x LA PCR pufr
Taq-Purple DNA polymeráza	1x Taq kompletní pufr
Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza	1x Phusion GC reakční pufr

Tabulka 5: Přehled použitých polymeráz a jejich reakční pufr

### 6.1.6 Roztoky

Připravené roztok glycerolu a L-arabiny byly sterilizovány pomocí filtrace (průměr pórů filtru 0,22 µm, firma ROTH)

10x DNA vzorkový pufr (100 mM EDTA, 20 % glycerolu, 1 % SDS a 0,25 % bromfenolová modř)

10% glycerol (10 ml glycerolu a 90 ml dH<sub>2</sub>O)

20% glycerol (20 ml glycerolu a 80 ml dH<sub>2</sub>O)

1M L-arabinóza (150 g/dm<sup>3</sup>)

0,05M TES pufr (229 g/ dm<sup>3</sup>, upraveno pH na 7,2)

1x TAE pufr (40 mM Tris-acetát a 1 mM EDTA)

### 6.1.7 Chemikálie

Aceton (Lach:ner)

Agaróza (SeaKem®)

Etanol (Lach:ner)

Ethidium bromid (Sigma-Aldrich)

Etylendiamintetraoctová kyselina

Glukóza (Lach:ner)

Glycerol (Lach:ner)

Isopropanol (Lach:ner)

Nonidet P-40 oktylfenoxypolyethoxyethanol (Almresco)

### 6.1.8 Antibiotika

Připravené zásobní roztoky antibiotik byla sterilizovány pomocí filtrace (průměr pórů filtru 0,22 µm, firma ROTH). Antibiotika uvedená v tab. 6 byla využita pro selekci a testování bakteriálních kmenů. Během testování produkce aktinorodinu byly také využity antibiotické disky tiamulinu (0,03 mg) připravený Mgr. Jakubem Lenartem a klindamycinu (2 mg) od firmy OXOID.

Antibiotikum	Pracovní koncentrace	Rozpustnost
Karbenicilin	100 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Apramycin	50 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Kanamycin	50 mg/l, 10 mg/l a 1 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Chloramfenikol	25 mg/l	etanol
Nalidixová kyselina	25 mg/l	0,3 M NaOH
Hygromycin	40 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Tiamulin	10 mg/l a 1 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Klindamycin	10 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Erytromycin	10 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Pristinamycin IA	10 mg/l	metanol
Pristinamycin IIA	10 mg/l	metanol
Linkomycin	10 mg/l	dH <sub>2</sub> O
Tetracyklin	10 mg/l	etanol

Tabulka 6: Přehled použitých antibiotik

### 6.1.9 Počítačová analýza

#### CLC Main Workbench 6.8.1

Program byl využit pro vyhodnocení sekvenční analýzy připravených konstruktů pro konstitutivní expresi *sco0636* a vytvoření fylogenetického stromy ABC-F proteinů z producentů antibiotik, patogenů a ABC-F proteinů z genomu *Streptomyces coelicolor*.

#### BLAST 2.8.0

Tato internetová stránka byla využívána pro porovnávání sekvencí a při tvorbě fylogenetického stromu.

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

#### GENBANK

Internetová stránka byly využívána pro zjišťování sekvencí podtřebných pro vytvoření fylogenetického stromu.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

## 6.2 Metody

### 6.2.1 Kultivace *Escherichia coli* a *Streptomyces coelicolor*

Buňky *Escherichia coli* byly kultivovány při 37 °C 16–18 hodin, na pevném LB agaru, nebo v tekutém LB mediu na třepačce při 200 RPM. V případě, že byly kultivovány kmeny nesoucí určitý vektor, bylo do media nebo pevného agaru přidáno příslušné selekční antibiotikum, které odpovídá rezistenci vektoru. Pro krátkodobé uchování byly plotny s narostlou kulturou obaleny parafilmem a nechány při 4 °C.

Buňky *Streptomyces coelicolor* byly kultivovány na pevném agaru (MS agar nebo DNA agar) nebo v tekutém médiu (YEME produkční) při 30 °C. Doba kultivace se lišila v závislosti na použitém mediu. Na DNA agaru kultivace probíhala 1–4 dny, na MS agaru až 7 dní, kultivace v tekutém médiu pro izolaci chromozomální DNA byla 16–20 hodin. Při kultivaci buněk vyžadující selekci na příslušné antibiotikum bylo toto antibiotikum přidáno do kultivační půdy, nebo do média. Krátkodobě byly uschovány narostlé kultury na parafilmem obalené Petriho misce při 4 °C, dlouhodobě pak v podobě spor při teplotě -80 °C.

### 6.2.2 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci tepelným šokem

- 1) Jedna kolonie *E. coli* XL-1 blue byla zaočkována do 10 ml LB média s tetracyklinem (10 mg/l) a kultivována přes noc (200 RPM, 16–18 hodin, 37 °C)
- 2) Do 100 ml vytemperovaného (37 °C) LB média bylo přidáno 100 µl 2M glukózy, 100 µl 1M MgSO<sub>4</sub>, 100 µl tetracyklinu (10 mg/l) a 1 ml přes noc narostlého inokula
- 3) Připravená buněčná suspenze byla kultivována (200 RPM, 37 °C) do dosažení OD<sub>600</sub> v rozmezí 0,4 – 0,6
- 4) Po dosažení potřebné OD<sub>600</sub> buňky byly zchlazeny v ledové lázni po dobu 10 minut (buňky od tohoto kroku byly drženy v ledové lázni, aby nedošlo ke snížení účinnosti transformace)
- 5) Buňky byly centrifugovány (1 500 g, 10 minut, 4 °C) v předem vychlazených zkumavkách o objemu 50 ml
- 6) Pelet byl opatrně resuspendován v 1 ml LB média s 0,02M glukosou a 0,01M MgSO<sub>4</sub>
- 7) K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 5 ml předchlazeného média pro uchovávání kompetentních buněk. Buňky byly následně rozděleny na 100µl alikvóty do vychlazených sterilních mikrozkušavek o objemu 1,5 ml a ihned použity k transformaci, nebo byly uschovány v -80 °C

### 6.2.3 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci elektroporací

Pro elektroporaci využít MicroPulser™ značky BIO RAD.

- 1) Jedna kolonie byla zaočkována do 10 ml LB média s příslušným antibiotikem (10 mg/l tetracyklinu pro buňky *E. coli* XL1-Blue a 25 mg/l kanamycinu a chloramfenikolu pro buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002) a suspenze byla kultivována (200 RPM, 16–18 hodin, 37 °C)
- 2) Do 100 ml LB média s antibiotikem (viz bod 1) byl zaočkován 1 ml přes noc narostlého inokula a suspenze byla kultivována na třepačce (200 RPM, 37 °C) do dosažení OD<sub>600</sub> 0,4 – 0,6
- 3) Po dosažení potřebné OD<sub>600</sub> byly buňky chlazeny 10 minut v ledové lázni a následně centrifugovány ve sterilních předchlazených zkumavkách (1 500 g, 5 minut, 4 °C)
- 4) Buňky byly 2x promyty 20 ml 10% glycerolu pro snížení iontové síly



- 5) Pelet byl resuspendován v 1 ml 10% glycerolu a rozdělen na 25 µl alikvóty do sterilních předchlazených 1,5 ml mikrozkupek
- 6) Buňky byly ihned použity pro transformaci, popřípadě uschovány při -80 °C.

#### **6.2.4 Příprava spor**

- 1) Po 4–7 dnech kultivace byly spory na MS agaru smyty sterilní destilovanou vodou
- 2) Spory byly přefiltrovány přes vatový filtr pro odstranění mycelia a centrifugovány (1 500 g, 15 minut, 4 °C)
- 3) Pelet byl resuspendován v 300 µl 20% glycerolu. Vzniklá suspenze spor byla přenesena do sterilních mikrozkupek o objemu 1, 5 ml a uchována v -80 °C

#### **6.2.5 Transformace tepelným šokem**

- 1) K alikvótě kompetentních buněk bylo přidáno dostatečné množství DNA (množství DNA by nemělo přesáhnout 50 ng/µl a buňky byly drženy na ledu)
- 2) Suspenze byla poklepem promíchána a inkubována 30 minut na ledu pro adhezi DNA na povrch buněk
- 3) Poté byly buňky vystaveny teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a následně chlazeny na ledu 5 minut
- 4) Byl přidán 1 ml LB media, a poté byly buňky kultivovány nejméně 1 hodinu na třepačce (200 RPM, 37 °C)

Buňky byly centrifugovány (2 300 g, 1 minuta, RT). Následně vysety na LB agar s antibiotikem odpovídající selekci transformantů kultivovány přes noc (16-18 hodin, 37 °C)

#### **6.2.6 Transformace elektroporací**

- 1) K alikvótě kompetentních buněk bylo přidáno adekvátní množství DNA (množství DNA by nemělo přesáhnout 50 ng/µl) a suspenze byla poklepem promíchána
- 2) Suspenze byla inkubována 20 minut na ledu pro adhezi přidané DNA k povrchu buněk
- 3) Buňky byly přeneseny (bez bublin) do vychlazené elektroporační kyvety a vystaveny působení elektrického výboje, jehož podmínky byly zvoleny podle manuálu výrobce pro použitou kyvetu (0,1 cm 18 kV/cm nebo 0,2 cm 12,5 kV/cm)
- 4) Ihned po elektrickém výboji byl k buňkám přidán 1 ml vychlazeného SOC média

- 5) Buňky byly kultivovány na třepačce (200 RPM, 37 °C) nejméně 1 hodinu, krátce centrifugovány (2 300 g, 1 minuta, RT), vysety na LB agar s příslušným antibiotikem pro selekci transformantů a kultivovány přes noc při 37 °C

### 6.2.7 Mezidruhov<sup>á</sup> konjugace

- 1) Do čerstvě připravených kompetentních buněk *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 byl elektroporací vnesen plazmid nebo kosmid (dle návodů výše)
- 2) Buňky byly vysety na LB agar s antibiotikem odpovídající rezistenci, kterou udílí natransformovaný plazmid, či kosmid a kultivovány přes noc (16-18 hodin, 37 °C)
- 3) Do 10 ml LB media s antibiotikem odpovídající rezistenci a udržení vlastností buněk *E. coli* na plazmidu nebo kosmidu byla zaočkována jedna kolonie po předcházející transformaci a suspenze byla kultivována přes noc (200 RPM, 37 °C)
- 4) Do 10 ml čerstvého LB media s antibiotikem (viz výše) bylo zaočkováno 100 µl přes noc narostlého inokula a suspenze byla kultivována do dosažení OD<sub>600</sub> 0,4 (200 RPM, 37 °C)
- 5) Po dosažení potřebné OD<sub>600</sub> byly buňky centrifugovány (1 500 g, 5 minut, 4 °C), a byly dvakrát promyty 10 ml LB media pro odstranění antibiotik, která by mohla inhibovat růst spor rodu *Streptomyces*. Vzniklý pelet buněk byl resuspendován v 1 ml LB media
- 6) Do 500 µl 2x YT media bylo přidáno 10 µl spor akceptorového kmene *Streptomyces* a suspenze byla inkubována při 50 °C 10 minut pro zahájení klíčení spor
- 7) K suspenzi spor bylo přidáno 500 µl připravených buněk *Escherichia coli* a jemně centrifugovány (2 300 g, 1 minuta, RT)
- 8) Poté byla odstraněna většina supernatantu, pelet byl opatrně resuspendován a vyset na MS agar s 10 mM MgCl<sub>2</sub> a plotna byla kultivována (16–20 hodin, 30 °C)
- 9) Naočkovaný MS agar byl převrstven 1 ml destilované vody s kyselinou nalidixovou (pro odstranění případných buněk *E. coli*) o výsledné koncentraci 25 mg/l a antibiotikem pro selekci vnášeného plazmidu či kosmidu a kultivace pokračovala
- 10) Po 5 dnech kultivace byly narostlé kolonie přeočkovány na čerstvý MS agar se selekčními antibiotiky pro ověření transformantů

### 6.2.8 Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci DNA byla využita komerční souprava Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Postupováno bylo podle přiloženého návodu od výrobce.

- 1) Do 5 ml LB média byla zaočkována jedna kolonie narostlého kmene
- 2) Přes noc narostlá kultura byla centrifugována (1 500 g, 5 minut, 4 °C)
- 3) Pelet byl resuspendován v 250 µl resuspedačního roztoku a bylo přidáno 250 µl lyzačního roztoku. Roztok byl následně promíchán převrácením (4x)
- 4) Bylo přidáno 10 µl alkalické proteázy. Obsah mikrozkušavky byla promíchán převrácením (4x) a byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě
- 5) Poté bylo přidáno 350 µl neutralizačního roztoku. Obsah mikrozkušavky byl promíchán převrácením (4x) a centrifugován (16 000 g, 10 minut, RT)
- 6) Supernatant byl přenesen do kolonky s membránou, centrifugován (16 000 g, 1 minutu, RT)
- 7) Bylo přidáno 750 µl promývacího roztoku a mikrozkušavka byla centrifugována (16 000 g, 1 minutu, RT). Následně bylo přidáno 250 µl promývacího roztoku a znovu byl roztok centrifugován jako předtím
- 8) Prázdná kolonka byla ještě jednou centrifugována (16 000 g, 2 minuty, RT) pro důkladné odstanění promývacího roztoku. A poté byla přenesena do nové sterilní mikrozkušavky. Bylo přidáno 100 µl sterilní vody a mikrozkušavka byla centrifugována (16 000 g, 1 minutu, RT)
- 9) Vyizolovaná DNA byla uschována při -20 °C

### 6.2.9 Izolace chromozomální DNA

Pro ověření deleční mutanty *Streptomyces coelicolor* M145 byla provedena PCR reakce a jako templátová DNA byla použita chromozomální DNA, která byla vyizolována komerční sadou Wizard® Genomic DNA Purification Kit

- 1) Do 500 µl TES pufru bylo zaočkováno 10 µl spor, ty byly inkubovány 10 minut při 50 °C pro aktivaci spor, pufr se spory byl doplněn YEME produkční médiem na objem 20 ml a nechán kultivovat v 50ml zkumavce při 30 °C přes noc
- 2) Přes noc narostlá kultura byla centrifugována (7 000 g, 10 minut, 4 °C)

- 3) Buňky byly resuspendovány v 480  $\mu\text{l}$  50mM EDTA, poté bylo přidáno 120  $\mu\text{l}$  lysozymu (lytický enzym o koncentraci 10 mg/ml) a buňky byly inkubovány 60 minut při teplotě 37 °C
- 4) Suspenze byla centrifugována (15 000 g, 2 minuty, RT) a byl odstraněn supernatant
- 5) Bylo přidáno 600  $\mu\text{l}$  lyzačního roztoku, suspenze byla pomocí pipety promíchána, inkubována 5 minut při 80 °C a poté zchlazena na pokojovou teplotu
- 6) Byly přidány 3  $\mu\text{l}$  roztoku s RNázou, obsah mikrozkušavky byl promíchán, inkubován 45 minut při 37 °C a zchlazen na pokojovou teplotu
- 7) Bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  srážecího roztoku, důkladně byl obsah promíchán pomocí vortexu a inkubován na ledu 5 minut
- 8) Suspenze byla následně centrifugována (16 000 g, 3 minuty, RT), supernatant byl přenesen do nové sterilní mikrozkušavky s 600  $\mu\text{l}$  isopropanolu
- 9) Směs byla centrifugována (16 000 g, 2 minuty, RT), supernatant byl odstraněn a pelet bylo promyt 600  $\mu\text{l}$  70% etanolu pokojové teploty
- 10) Mikrozkušavka byla opět centrifugována (16 000 g, 2 minuty, RT). Etanol byl odstraněn a poté byla mikrozkušavka ponechána na vzduchu 15 minut pro odpaření etanolu
- 11) Získaná DNA byla rehydratována 100  $\mu\text{l}$  rehydratačního roztoku při 65 °C 1 hodinu, popřípadě při 4 °C přes noc

### 6.2.10 Polymerázová řetězová reakce

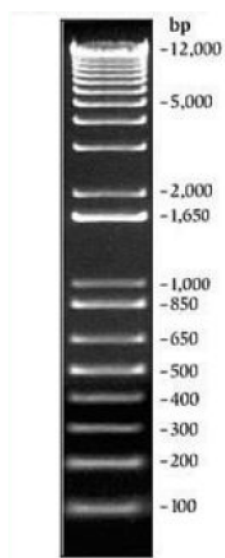
Polymerázová řetězová reakce je jednou z nejvyužívanějších metod molekulární biologie a je využívána pro amplifikaci žádaných DNA. Úseky jsou určeny oligonukleotidy neboli primery. Při této diplomové práci byl celkový objem reakce 25 nebo 50  $\mu\text{l}$ . Obecný průběh reakce je uveden v tab. 7.

Teplota	Čas	Fáze	Počet cyklů
98 °C	5 minut pro PCR s plazmidovou DNA 10 minut pro koloniovou PCR	Úvodní denaturace	1
94 °C	45 sekund	Denaturace	25-35
50–72 °C	45 sekund	Nasednutí primerů	
72 °C	Podle délky přepisovaného úseku a použité polymerázy	Extenze	
72 °C	10 minut	Konečná extenze	1

Tabulka 7: Podmínky PCR reakce

### 6.2.11 DNA elektroforéza

DNA elektroforéza byla prováděna v agarózovém gelu. Byl připravován 1% gel a pro vizualizaci separovaných fragmentů pod ultrafialovým světlem byl využíván etidiumbromid. Agarózový gel byl připravován v objemu 50 ml: 0,5 g agarózy a 50 ml TAE pufru, směs byla následně zahřata pro rozpuštění agarózy a po schlazení byly přidány 3  $\mu$ l ethidium bromidu. Během mé diplomové práce byl jako hmotnostní standard použit 1 Kb Plus DNA ladder. Fragment o velikosti 1 650 bp obsahuje 40 ng DNA při nanesení 5  $\mu$ l standardu a na základě toho lze odhadnout koncentraci DNA vzorku. Hmotnostní standard byl připraven smícháním 100  $\mu$ l 1 kb Plus DNA ladder, 100  $\mu$ l 10x DNA vzorkového pufru a 800  $\mu$ l TE<sup>-1</sup> pufru.



Obrázek 15: 1Kb Plus DNA ladder (převzato a upraveno  
<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/GibcoBRL1kbPlus.gif>)

### 6.2.12 Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu

Pomocí elektroforézy byla rozdělena DNA vzorku a následně cílený fragment pod UV světlem byl vyizolován z agarosového gelu.

Pro izolaci DNA fragmentů byla využita komerční souprava Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System.

Postupováno bylo dle návodu výrobce:

- 1) Gel byl rozpuštěn při teplotě 65 °C v odpovídajícím množství membráno vazebném roztoku (10  $\mu$ l roztoku na 10 mg gelu)



- 2) Roztok s rozpuštěným gelem byl přenesen do kolonky s membránou a inkubován 1 minutu při pokojové teplotě. Poté byl centrifugován (16 000 g, 1 minuta, RT)
- 3) Kolonka byla promyta 700 µl promývacího roztoku obsahující etanol a následně centrifugována (16 000 g, 1 minuta, RT)
- 4) Bylo přidáno 500 µl promývacího roztoku a roztok byl centrifugován (16 000 g, 5 minut, RT)
- 5) Prázdná kolonka byla ještě jednou centrifugována (16 000 g, 1 minuta, RT) pro odstranění zbylého etanolu. Poté bylo přidáno 50 µl sterilní destilované vody a obsah byl centrifugován (16 000 g, 1 minuta, RT)
- 6) Přechistěná DNA byla uchována při 4 °C nebo -20 °C

### 6.2.13 Restrikční štěpení DNA

Restrikční štěpení bylo využito pro získání inaktivační kazety 773 z plazmidu pIJ773, pro ověření inserce rezistenční kazety do kosmidu 7G01 a pro vyštěpení genu *sco0636* z kosmidu 7G01 pro přípravu konstitutivní exprese. Optimální reakční podmínky byly zvoleny dle protokolu a doporučení výrobce pro daný enzym. Celkový objem reakce byl vždy přizpůsoben dalšímu využití reakce. Obvykle byla připravena reakce o objemu 50 µl s 1 µl enzymu na 1 µg DNA s dobou štěpení 60 minut. Obecné složení reakce uvedeno v tab. 8.

Složení reakce	Množství
Restrikční enzym	1 U/1 µg DNA
Reakční pufr	1/10 objemu reakce
DNA	Dle koncentrace (100 ng/µl)
dH <sub>2</sub> O	Doplnit do celkového objemu reakce

Tabulka 8: Složení reakční směsi restrikčního štěpení

### 6.2.14 Ligační reakce

Ligační reakce byla připravena dle návodu a aplikace výrobce na webových stránkách: <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>.

Vybraný amplifikovaný a restrikčně opracovaný úsek DNA byl vložen pomocí T4 ligázy do naštěpeného plazmidu. Připravený a ověřený plazmid pomocí PCR reakce byl následně mezidruhovou konjugací vložen do deleční mutanty genu *sco0636*, kmene *Streptomyces coelicolor* M145 a M1154.

### 6.2.15 Sekvenační analýza DNA

Připravené konstrukty pro konstitutivní expresi genu *sco0636* byly zaslány do firmy GATC Biotech. Vzorky byly zaslány v podobě premixu o objemu 10 µl: 5 µl plazmidové DNA (koncentrace 80–100 ng/ µl) a 5 µl příslušného primeru (5 µM).

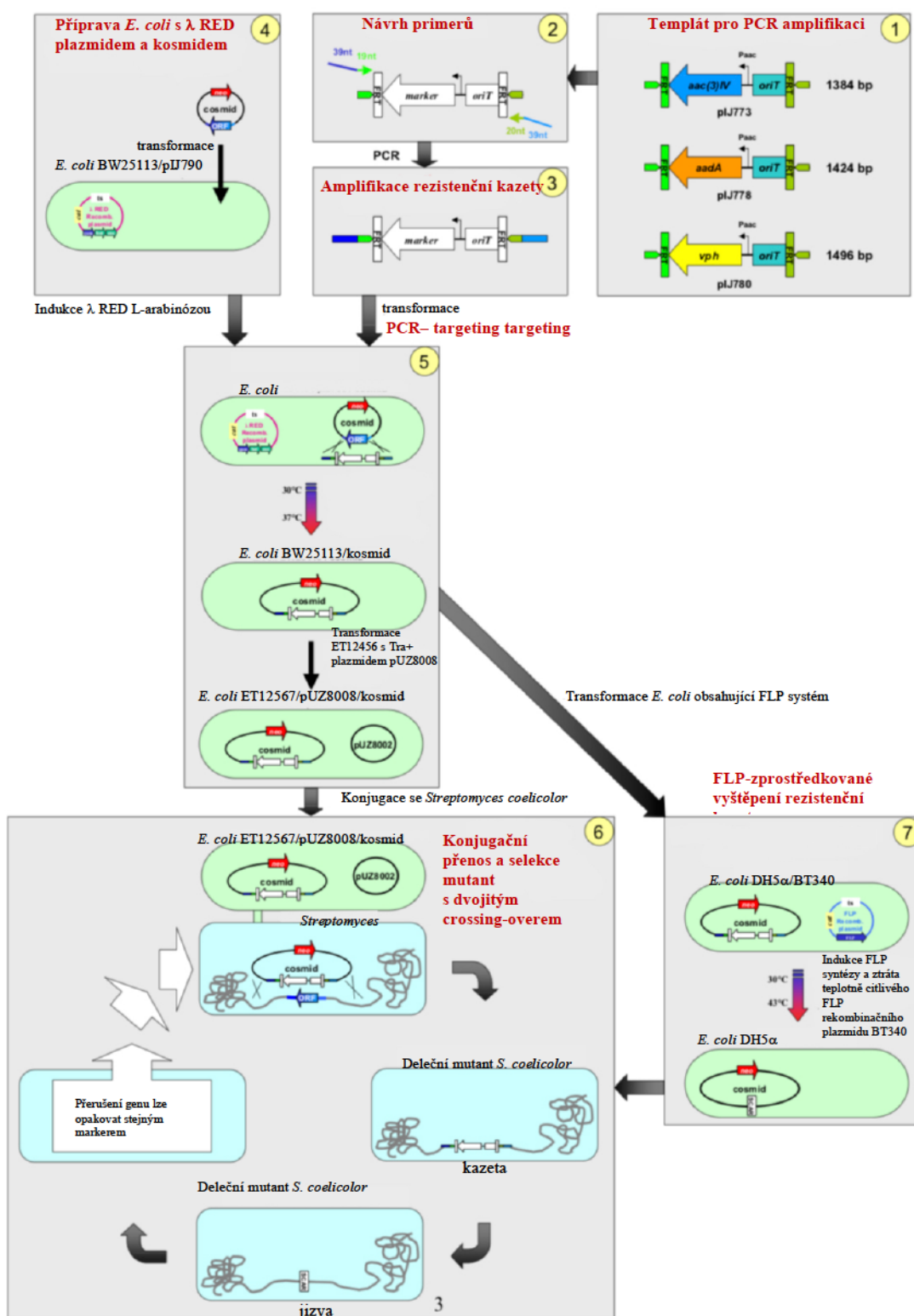
### 6.2.16 Fylogenetická analýza

Pro zjištění nejbližšího homologu ABC-F proteinu Lmr(C) byly proteiny srovnány pomocí aplikace BLAST 2.8.0 [databáze: Non-redundant protein sequences (nr), algoritmus: blastp (protein-protein BLAST)] vůči *Streptomyces coelicolor* A3(2) taxon 100226 a vybrány do sekvenční podobnosti 30 %. Pro doplnění fylogenetického stromu byly ještě do analýzy přidány ABC-F proteiny od dalších producentů antibiotik a od patogenních organismů. Sekvence proteinů byla zjištěna pomocí internetové aplikace GENBANK. Pomocí programu CLC Main Workbench 6.8.1 byl vytvořen alignment a následně fylogenetický strom za použití algoritmus UPGMA.

### 6.2.17 PCR targeting – metoda inaktivace genů

Pro přípravu deleční mutanty *Streptomyces coelicolor* M145, ve kterém byl inaktivován gen *sco0636*, byla využita metoda PCR targeting (Gust a kol. 2003), jejíž protokol je volně dostupný na internetových stránkách: [http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol\\_V1\\_4.pdf](http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf). Princip této metody je založen na výměně vybraného genu za rezistenční kazetu pomocí dvojitého crossing-overu. Při mé diplomové práci byla využita kazeta 773 s apramycinovou rezistencí, která dále obsahuje *oriT* pro mobilizaci konstruktu a FRT sekvenci, jenž je rozeznávána FLP rekombinázou.

Nejprve došlo k přípravě kosmidu s rezistenční kazetou, jenž nesla selekční marker. Tento krok byl připravován v buňkách *Escherichia coli* BW25113, kde došlo k výměně cíleného genu za rezistenční kazetu. Poté byl kosmid nesoucí kazetu mezidruhovou konjugací vložen do *Streptomyces coelicolor* M145, kde došlo buď k jednoduchému nebo dvojitému crossing overu. Při jednoduchém crossing overu proběhla rekombinace okolí inaktivovaného genu a kosmidu s kazetou. V chromozomu *Streptomyces coelicolor* M145, pak zůstal jak původní gen, tak i modifikovaný kosmid. Při dvojitém crossing overu došlo k rekombinaci okolí genu a rezistenční kazety. Rezistenční kazeta se vyměnila za původního genu. Vzniklá deleční mutanta pak byla rezistentní na selekční marker kazety a citlivá na marker kosmidu, který nesl rezistenční kazetu.



Obrázek 16: Schéma metody PCR-targeting (převzato a upraveno [http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol\\_V1\\_4.pdf](http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf))

### 6.2.18 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

U připravené deleční mutanty byly testovány minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí agarové diluční metody. Testování probíhalo na MH agaru s narůstající koncentrací testovaných antibiotik. Pro testování byly vybrány následující antibiotika: tiamulin (TIA) v koncentracích 0,016 – 0,5 mg/l a 8 – 256 mg/l, klindamycin (CLI) 2 – 256 mg/l, erytromycin (ERY) 4 – 64 mg/l, pristinamycin IA (PIA) 8 – 64 mg/l, pristinamycin IIA (PIIA) mg/l, linkomycin (LIN) 1 – 128 mg/l, chloramfenikol (CMN) 4 – 128 mg/l, tetracyklin (TET) 4 – 128 mg/l a kanamycin (KAN) 0,03 – 128 mg/l.

- 1) Pro každé testované antibiotikum byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mg/l a pro KAN a TIA navíc zásobní roztok o koncentraci 1 mg/l.
- 2) Testovací půdy pro stanovení MIC byly připraveny podle tab. 9.
- 3) Byla připravena suspenze spor testovaných kmenů o zákalu 0,5–0,6 McFarlanda (do 2 ml destilované vody bylo přidáno dle zákalu přidáno 5 – 20  $\mu$ l zásobních spor)
- 4) Pro lepší nanášení byla část suspenze přenesena do mikrotitrační destičky odkud multikanálovou pipetou bylo nanášeno 5  $\mu$ l na připravené testovací půdy
- 5) Po uschnutí suspenze následovala kultivace v 30 °C po dobu 5 dní
- 6) Stanovení MIC bylo provedeno 5. den kultivace

<b>Zásobní koncentrace roztoku antibiotika</b>	<b>ATB</b>	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	<b>MH-agar</b>	<b>Koncentrace</b>
<b>10 mg/l</b>	512 µl	488 µl	19 ml	256
	256 µl	744 µl	19 ml	128
	128 µl	872 µl	19 ml	64
	64 µl	936 µl	19 ml	32
	32 µl	968 µl	19 ml	16
	16 µl	984 µl	19 ml	8
	8 µl	992 µl	19 ml	4
	4 µl	996 µl	19 ml	2
	2 µl	998 µl	19 ml	1
<b>1 mg/l</b>	10 µl	990 µl	19 ml	0,5
	5 µl	995 µl	19 ml	0,25
	2,5 µl	997,5 µl	19 ml	0,125
	1,2 µl	998,8 µl	19 ml	0,06
	0,6 µl	999,4 µl	19 ml	0,03
	0,03 µl	999,7 µl	19 ml	0,016

Tabulka 9: Přehled ředění antibiotik pro přípravu testovacích půd



## 7 Výsledky

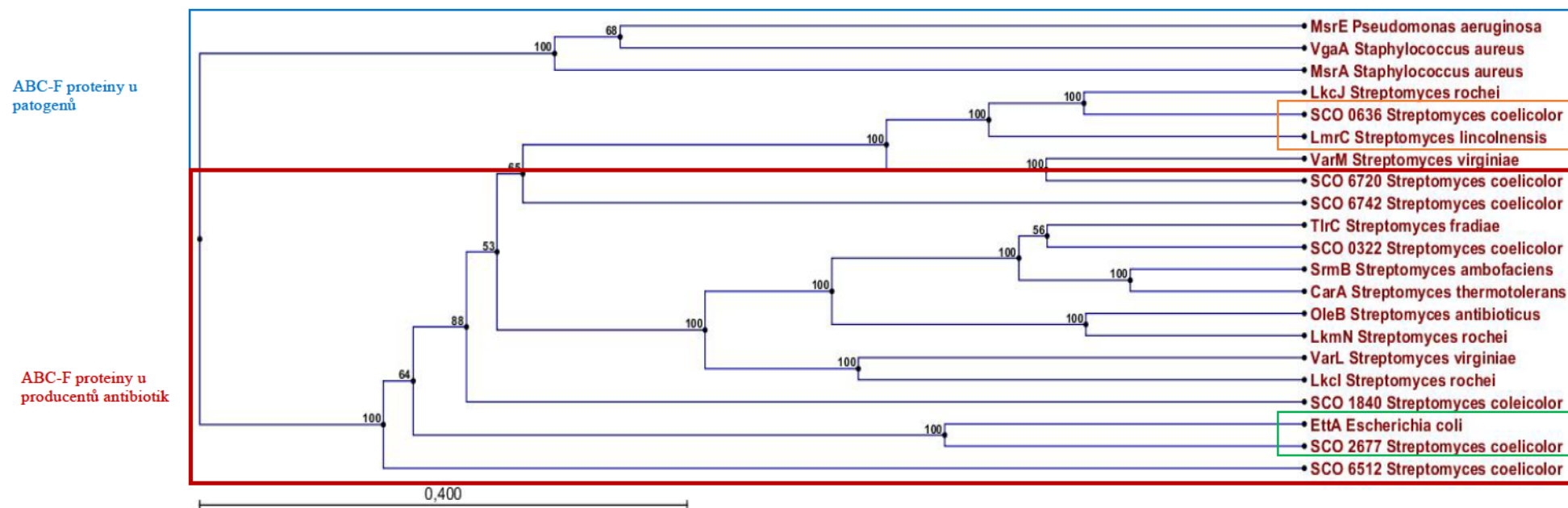
Tato diplomová práce se zabývá studiem proteinu Sco0636 ze *Streptomyces coelicolor*, homologního proteinu Lmr(C) ze *Streptomyces lincolnensis*. V prvním kroku byly připraveny deleční mutanty *sco0636* v divokém kmeni *Streptomyces coelicolor* M145. Dále byl připraven konstrukt pro konstitutivní expresi genu *sco0636*, který byl mezidruhovou konjugací vložen do divokého kmene *Streptomyces coelicolor* M145, do citlivého kmene *Streptomyces coelicolor* M1154 a do připravených nezávislých delečních mutant. Do divokého kmene *Streptomyces coelicolor* M145 byl také vložen plazmid nesoucí gen *lmr(C)*, který byl připraven Mgr. Ludmilou Veselou. U připravených kmenů byly testovány minimální inhibiční koncentrace u vybraných antibiotik a sledován vliv na produkci aktinorodinu.

### 7.1 Komparativní analýza ABC-F proteinů

Na základě sekvenční podobnosti byl vytvořen fylogenetický strom vybraných ABC-F proteinů z producentů antibiotik, patogenů a ABC-F proteinů od *Streptomyces coelicolor*. Na obr. 17 je i vidět nejbližší homolog proteinu Lmr(C), kterým je protein Sco0636 se sekvenční podobností 62 %.

Dále byla provedena analýza počtu ABC-F proteinů u *Streptomyces coelicolor* a byla srovnána s ostatními z rodu *Streptomyces*, jinými producenty antibiotik a vybranými patogenními zástupci. Pro tuto analýzu byla využita data z publikace Murina *et al.*, 2017 a bylo srovnáno 120 kmenů z rodu *Streptomyces*, 10 dalších producentů antibiotik z rodů *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Micromonospora* a 35 patogenních zástupců z rodů *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Proteus*.

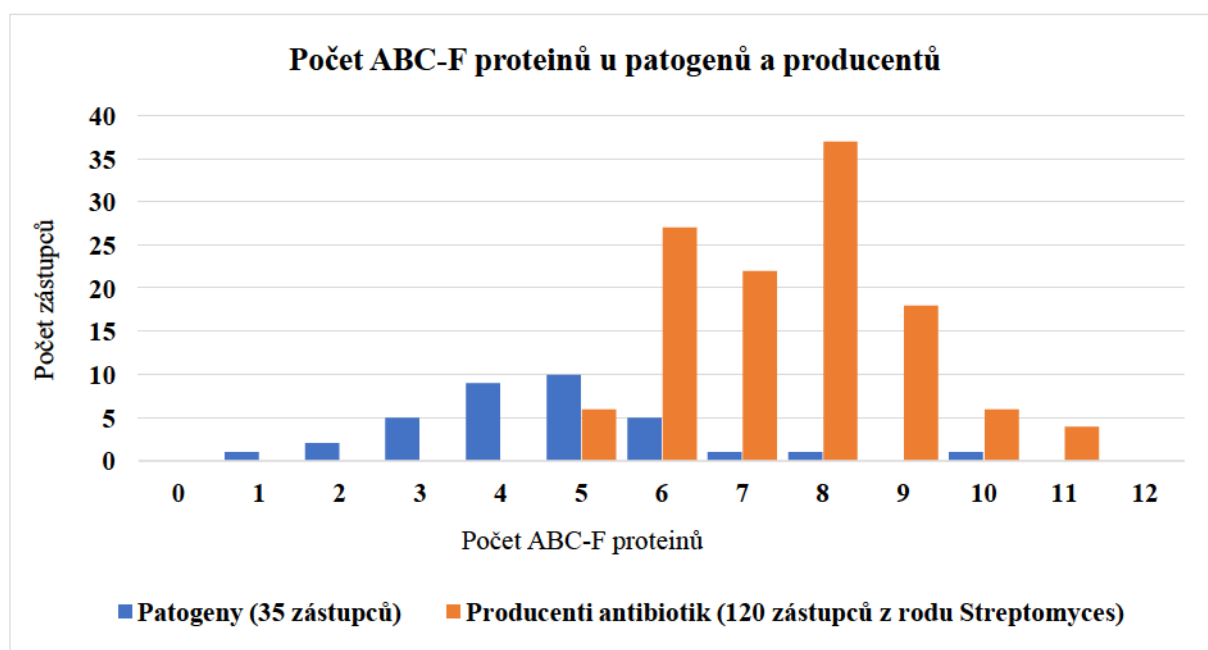
Analýza ukazuje, že se u producentů antibiotik nachází 5 až 11 ABC-F proteinů (Graf 1), z nichž dva jsou společné všem testovaným producentům antibiotik: homolog translačního faktoru EttA (popsán v kapitole 2.2.1) a homolog proteinu Uup, který patří do REG podrodiny (klasifikace SBC transportérů popsána v kapitole 2.2). Celkový počet ABC-F proteinů je pak doplněn o AAF proteiny a ARE proteiny. Konkrétně pak u *Streptomyces coelicolor* se nachází 7 ABC-F proteinů.



Obrázek 17: Fylogenetický strom ABC-F proteinů. Oranžově vyznačeny nejbližší homology Sco0636 a Lmr(C), zeleně vyznačeny translační faktor EttA a jeho homolog u *Streptomyces coelicolor*

U patogenních mikroorganismů bylo zjištěno, že se u nich nachází 1 až 10 ABC-F proteinů, ale nejčastější počet byl 4 a 5 proteinů (Graf 1). Vyšší počet proteinů mají jen 3 zástupci: *Enterococcus faecium* 7 ABC-F proteinů, *Bacillus anthracis* 10 ABC-F proteinů a *Bacillus cereus* 8 ABC-F proteinů. Všichni zástupci patogenů měli homolog proteinu Uup až na *Helicobacter pylori*, jenž má pouze 1 ABC-F protein (YbiT). Společně s homologem Uup se jen u některých také nacházel homolog translačního faktoru EttA.

Vyšší počet ABC-F proteinů u producentů antibiotik zřejmě souvisí s jejich složitějším životním cyklem a rozvinutým sekundárním metabolismem.



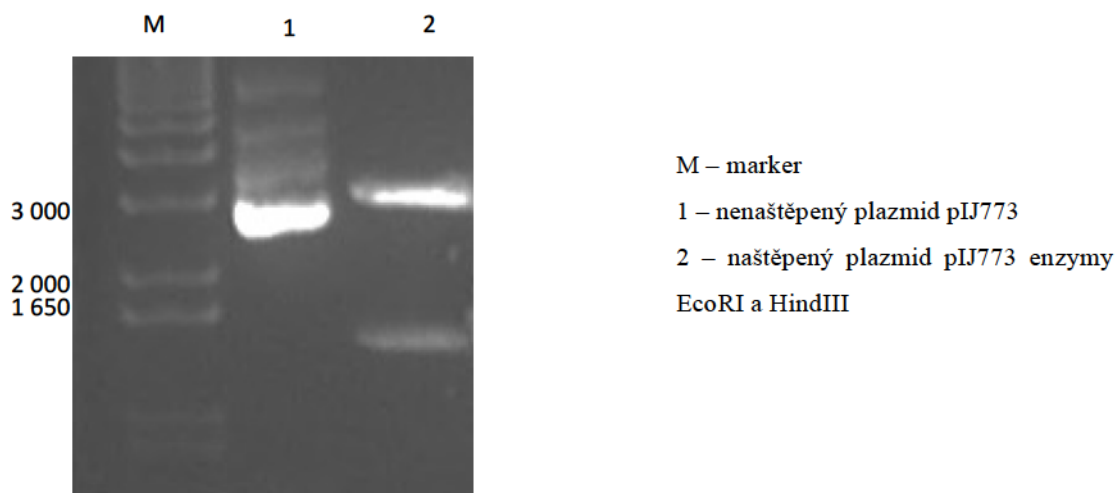
Graf 1: Srovnání počtu ABC-F proteinů u patogenů a producentů antibiotik

## 7.2 Příprava deleční mutanty *sco0636*

Prvním krokem při přípravě deleční mutanty bylo získání rezistenční kazety 773, která byla pomocí restričních endonukleáz EcoRI a HindIII vyštěpena z plazmidu pIJ773. Tato reakce byla připravena (Tab. 10) o celkovém objemu 50  $\mu$ l a byla inkubována při 37 °C 3 hodiny. Ověření naštěpení plazmidu bylo provedeno pomocí elektroforézy, kdy očekávané fragmenty byly 2 938 bp a 1 396 bp (Obr. 18).

Složení reakce	množství
Plazmid pIJ773 (354 ng/μl)	15 μl
Enzym EcoRI	0,5 μl
Enzym HindIII	0,5 μl
10x Cutsmart pufr	5 μl
dH <sub>2</sub> O	29 μl

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro štěpení restrikční endonukleázou

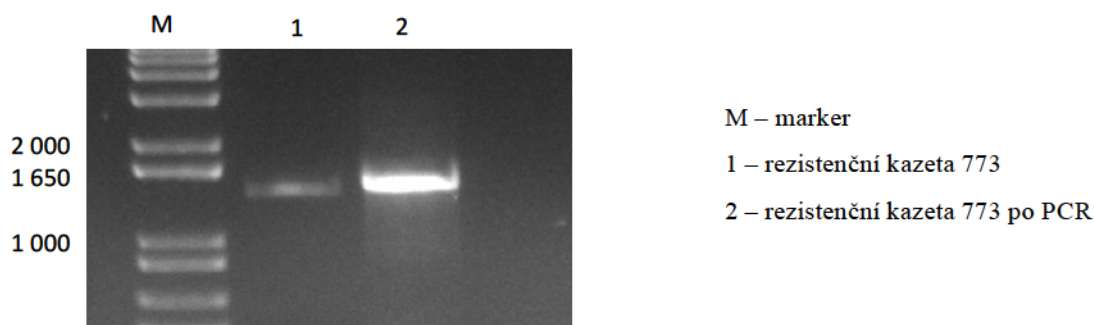


Obrázek 18: Vyštěpení kazety 773 enzymy BamHI a HindIII

Nižší fragment naštěpeného plazmidu odpovídá rezistenční kazetě a tento fragment byl vyizolován kitem (kapitola 6.2.12). Získaný produkt byl následně použit jako templátová DNA pro PCR reakci (Tab. 11), při které došlo pomocí primerů k amplifikaci okolí inaktivovaného genu a rezistenční kazety 773. PCR produkt byl přečištěn a 5 μl tohoto produktu bylo elektroforézou ověřeno (Obr. 19).

Složení PCR reakce	množství
Primery (Sco0636FW a Sco0636R)	0,5 μl
Kazeta 773 (11,3 ng/μl)	0,5 μl
Phusion HF 5x GC reakční pufr	5 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
100% DMSO	2,5 μl
Phusion DNA polymeráza	1 μl
dH <sub>2</sub> O	36 μl

Tabulka 11: Složení PCR reakce pro amplifikace rezistenční kazety 773



Obrázek 19: Elektroforéza po PCR amplifikaci rezistenční kazety 773

Pomocí elektroporace byl transformován kosmid 7G01 (nesoucí gen *sco0636*) do buněk *Escherichia coli* BW25113/pIJ790. Buňky byly vysety na LB agar s karbenicilinem 100 mg/l, chloramfenikolem 25 mg/l a kanamycinem 50 mg/l a kultivovány při 30 °C 16-18 hodin. Narostlé kolonie byly použity pro přípravu kompetentních buněk pro transformaci PCR produktu, amplifikované rezistenční kazety. Po transformaci amplifikované kazety do buněk s kosmidem 7G01, byly buňky vysety na plotnu s LB agarem obsahující karbenicilin 100 mg/l, kanamycin 50 mg/l, apramycin 50 mg/l a plotna byla kultivována při 37 °C pro ztrátu teplotně senzitivního plazmidu pIJ790. Po 16 hodinách na agaru vyrostly větší a menší kolonie. Dle protokolu byly pro další krok využity větší kolonie, které obsahují větší počet kopií modifikovaného kosmidu. Náhodně bylo vybráno 6 kolonií a ty byly zaočkovány do LB média s karbenicilinem 100 mg/l, kanamycinem 50 mg/l, apramycinem 50 mg/l a kultivovány do OD<sub>600</sub> 0,1 – 0,3. Po 6 hodinách kultivace byla vyizolována plazmidová DNA již jen u 3 kolonií, zbylé nedosáhly potřebné OD<sub>600</sub>. U těchto kolonií bylo ověřeno nahrazení inaktivovaného genu *sco0636* rezistenční kazetou 773 pomocí restrikčních endonukleáz XhoI a BamHI. Reakce byla připravena pro každý kosmid a pro kontrolu v celkovém objemu 25 µl (Tab. 12) a byla inkubována při 37 °C 3 hodiny. Jako kontrola naštěpení připravených kosmidů s rezistenční kazetou byl použit původní kosmid (7G01). Očekávané fragmenty po naštěpení jsou uvedeny v tab. 13 a výsledná elektroforéza je zobrazena na obr. 20.

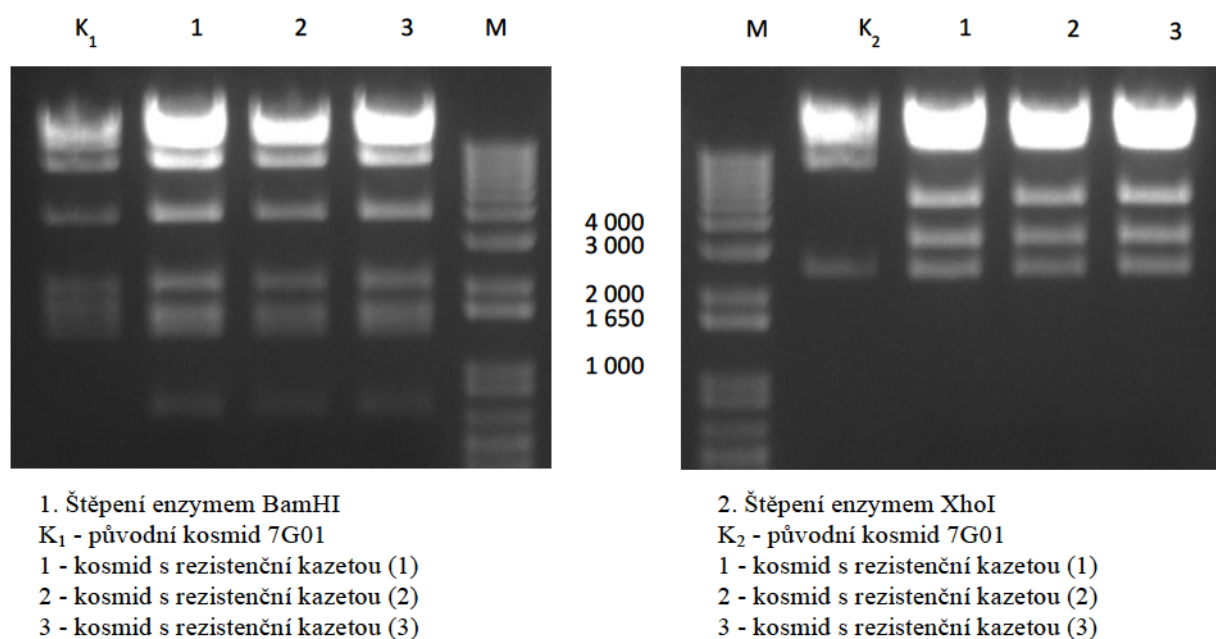
Složení reakce	množství
Kosmid 1, 2, 3 (296 ng/ µl, 170 ng/µl, 252 ng/µl)	10 µl
Enzym BamHI	0,25 µl
Enzym XhoI	0,25 µl
10x Cutsmart pufr	2,5 µl
dH <sub>2</sub> O	12,25 µl

Tabulka 12: Složení reakční směsi pro štěpení restrikční endonukleázou



Očekávané fragmenty			
štěpení BamHI		štěpení XhoI	
7G01	kosmid s rezistenční kazetou	7G01	kosmid s rezistenční kazetou
35	35	151	151
	731	2 337	2 337
1 392	1 392		3 099
1 586	1 586		4 750
1 760		8 105	7185
2 018	2 018		10 349
3 791	3 791	13 226	13 225
13 616	12 993	17 534	
18 554	18 554		

Tabulka 13: Očekávané fragmenty štěpení enzymy (BamHI a XhoI) pro ověření inserce rezistenční kazety 773 a červeně označeny rozdílné fragmenty



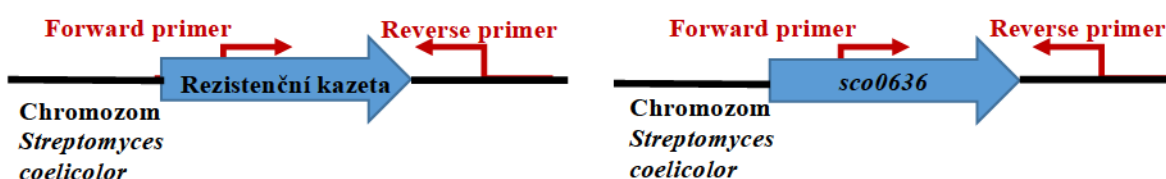
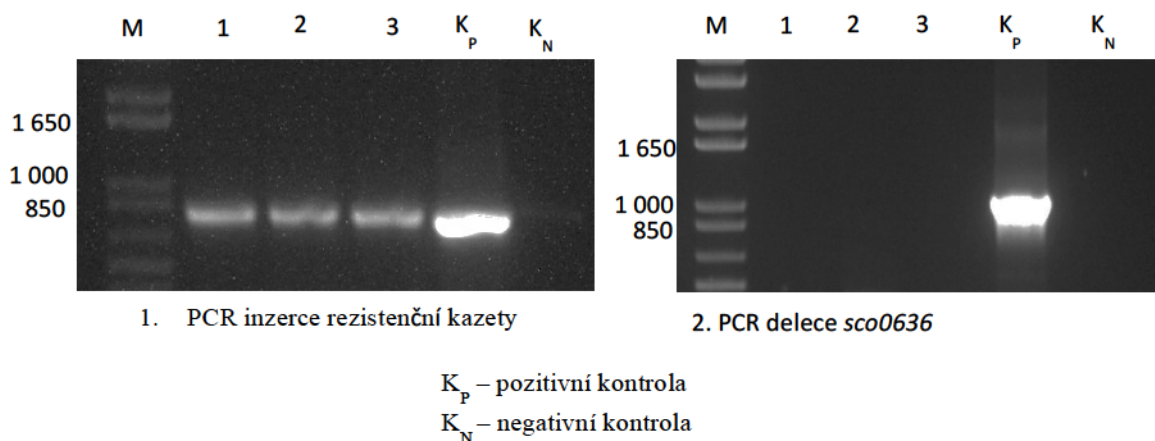
Obrázek 20: Ověření modifikovaných kosmidů pomocí restrikčních endonukleáz

U kosmidů s kazetou 773 byl v porovnání s původním kosmidem navíc fragment o velikosti 731 bp při štěpení enzymem BamHI a při naštěpení enzymem XhoI byly navíc fragmenty o velikosti 3 099 a 4 750 u kosmidů s apramycinovou kazetou. Ověřené kosmidy byly elektroporací transformovány do buněk *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 a tyto buňky byly následně použity pro mezidruhovou konjugaci se *Streptomyces coelicolor* M145. Po 16–20 hodinách byly plotny s MS agarem převrstveny 1 ml roztoku obsahující apramycin

50 mg/l, nalidixovou kyselinu 25 mg/l a kultivovány při 30 °C 5 dní. Poté byly jednotlivé narostlé kolonie přeočkovány na MS agar s apramycinem 50 mg/l. Po konjugaci byla provedena selekce delečních mutant, u kterých došlo ke dvojitému crossing-overu. Jednotlivé kolonie byly tak přeočkovány na DNA agar s apramycinem 50 mg/l a s kanamycinem 50 mg/l, s apramycinem 50 mg/l a bez kanamycinu 50 mg/l. Deleční mutanty byly apramycin rezistentní a kanamycin citlivé (kapitola 6.2.15). U těchto kolonií byla vyizolována DNA a byly ověřeny pomocí PCR reakce, kdy byly využity dvě sady primerů. První sada primerů nasedala uvnitř a za rezistenční kazetou (ověření integrace kazety), jako pozitivní kontrola byl využit jeden z ověřených modifikovaných kosmidů a přepisovaný úsek měl velikost 793 bp. Druhá sada primerů nasedala uvnitř a za genem *sco0636* (ověření delece genu), přepisovaný úsek byl o velikosti 1 058 bp a jako pozitivní kontrola byl využit původní kosmid (7G01). Složení PCR reakce uvedeno v tab. 14 a výsledná elektroforéza na obr. 21.

Složení PCR reakce	množství
Primery (kazeta773for a testovací 0636R) (testovací delece 0636 a testovací 0636R)	0,5 µl
Kolonie a kosmid 7G01 (286 ng/µl)	1 µl
Taq 10x GC kompletní pufr	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
100% DMSO	2,5 µl
Taq DNA polymeráza	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	39 µl

Tabulka 14: Složení PCR reakce pro ověření delečních mutant



Obrázek 21: Elektroforéza po PCR reakci pro ověření inzerce rezistenční kazety a delece genu *sco0636* a schéma nasednutí dvou sad kontrolních primerů

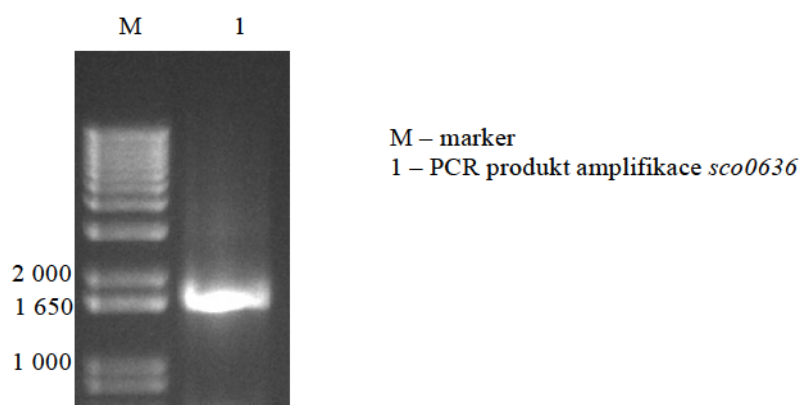
Podle výsledků první PCR reakce, došlo u pozitivní kontroly k přepisu očekávaného fragmentu a při porovnání s testovanými mutanty, u všech mutant došlo k inzerce rezistenční kazety. Dle výsledků druhé PCR reakce, u pozitivní kontroly došlo k přepisu očekávaného fragmentu. U testovaných mutant nedošlo k přepisu téhož fragmentu, došlo tedy k deleci genu *sco0636*. Ověřené deleční mutanty byly dlouhodobě uchovány v podobě suspenze spor v  $-80^{\circ}\text{C}$  a následně testovány.

### 7.3 Příprava konstruktů pro konstitutivní expresi *sco0636*

Pro ověření funkce inaktivovaného genu bylo nutné provést komplementaci. Do vektoru pIJ10257 byl za konstitutivní promotor (*ermEp*) vložen gen *sco0636*. Tento gen byl pomocí PCR reakce (Tab. 15) amplifikován společně s restrikčními místy, které umožnily vložení do vektoru. Jako templátová DNA byl využit kosmid 7G01. Amplifikace úseku byla poté ověřena pomocí elektroforézy (Obr. 22), kdy očekávaný fragment byl o velikosti 1 650 bp.

Složení PCR reakce	množství
Primery (Sco0636pJIFW a Sco0636pIJRev)	0,5 µl
Kosmid 7G01 (286 ng/µl)	1 µl
Phusion HF reakční pufr	10 µl
dNTPs (10 mM)	1,5 µl
100% DMSO	2,5 µl
Phusion polymeráza	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	34 µl

Tabulka 15: Složení PCR reakce pro amplifikaci genu *sco0636*



Obrázek 22: Elektroforéza po PCR amplifikaci *sco0636*

Tento fragment byl izolován kitem (kapitola 6.2.12) a společně s vektorem pIJ10257 naštěpen restrikčními endonukleázami (Tab. 16 a 17). V obou případech byly použity stejné enzymy: NdeI a XhoI. Naštěpený úsek odpovídající genu (1 650 bp) a naštěpený vektor byly přečištěny a poté byla připravena ligační směs v poměru 5:1 dle <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> a její složení je uvedeno v tab. 18.

Složení reakce	množství
Amplifikovaný <i>sco0636</i> (38 ng/µl)	20 µl
Enzym NdeI	0,5 µl
Enzym XhoI	0,5 µl
10x Cutsmart pufr	5 µl
dH <sub>2</sub> O	24 µl

Tabulka 16: Složení reakční směsi štěpení PCR produktu po amplifikaci *sco0636*

Složení reakce	množství
Plazmid pIJ10257 (483 ng/μl)	5 μl
Enzym NdeI	1 μl
Enzym XhoI	1 μl
10x Cutsmart pufr	5 μl
dH <sub>2</sub> O	38 μl

Tabulka 17: Složení reakční směsi štěpení plazmidu pIJ10257

Složení ligační reakce	množství
T4 DNA ligační pufr	2 μl
pIJ10257 (28 ng/μl)	4 μl
Amplifikovaný a naštěpený <i>sco0636</i> (11,5 ng/μl)	11 μl
T4 DNA ligáza	1 μl
ATP	0,2 μl
dH <sub>2</sub> O	1,8 μl

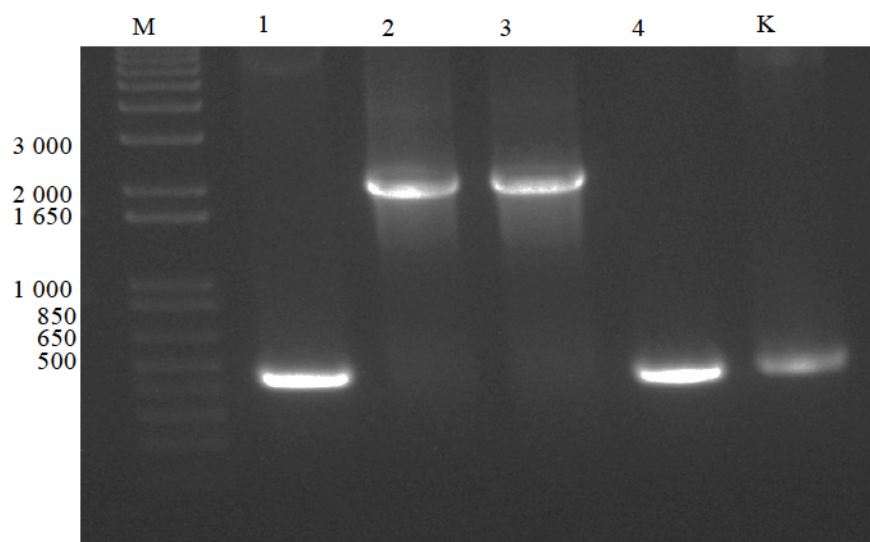
Tabulka 18: Složení ligační reakce

Směs byla transformována do buněk *E. coli* XL-1 Blue. Po kultivaci z narostlých kolonií byly vybrány 4, u kterých byla vyizolována plazmidová DNA pro PCR ověření inserce genu *sco0636*. Byly využity primery nasedající před a za úsek, kam byl inzertován gen. Složení reakce je uvedeno v tab. 19. Přepisovaný úsek při správném vložení genu byl 2 102 bp. Jako kontrola byl využit prázdný plazmid pIJ10257, kde se přepisoval fragment o velikosti 474 bp (Obr. 23).

Složení PCR reakce	množství
Primery (testpIJ10257fwnew a testpIJ10257Rnew)	0,5 μl
DNA kolonie 1, 2, 3, 4 a plazmid pIJ10257 (106 ng/μl, 72 ng/μl, 34 ng/μl, 19 ng/μl a 483 ng/μl)	5 μl
LA PCR pufr	5 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
100% DMSO	2,5 μl
LA polymeráza	0,5 μl
dH <sub>2</sub> O	35 μl

Tabulka 19: Složení PCR reakce pro ověření inserce *sco0636* do vektoru pIJ10257





- M – marker  
 1 – plazmidová DNA kolonie 1  
 2 - plazmidová DNA kolonie 2  
 3 - plazmidová DNA kolonie 3  
 4 - plazmidová DNA kolonie 4  
 K – prázdný plazmid pIJ10257

Obrázek 23: Elektroforéza po PCR pro ověření inserce *sco0636* do vektoru pIJ10257

Ze 4 ověřených plazmidů, byly dva s očekávaným přepisem (2 102 bp). Tyto plazmidy byly ověřeny pomocí sekvenace. Dle výsledků sekvenace byly oba plazmidy vhodné pro další použití. Pro následnou transformaci a mezidruhovou konjugaci do testovaného kmene *Streptomyces celicolor* M145 a citlivého kmene *Streptomyces celicolor* M1154 byl použit již jen plazmid 3.

## 7.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Stanovení MIC bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 6.2.16. U TIA, CLI a LIN byla MIC stanovena ve třech nezávislých testováních. Pro zbylá antibiotika byla MIC stanovena ve dvou testováních. Výsledky stanovení MIC uvedeny v tab. 20 a testování MIC bylo provedeno u tří nezávislých delečních mutant.

Výrazný rozdíl byl patrný při testování TIA. Při porovnání divokého kmene s prázdným vektorem (M145+pIJ10257) a delečních mutant (M145 $\Delta$ 0636) došlo k výraznému snížení MIC. MIC byla u divokého kmene větší než 256 mg/l a u delečních mutant byla 0,25 mg/l. Při porovnání delečních mutant a konstitutivní exprese *sco0636* jak v divokém kmeni

(M145+ermEpsco0636), tak v delečních mutantách (M145 $\Delta$ 0636+ermEpsco0636), došlo k navrácení MIC z 0,25 mg/l na hodnotu vyšší jako 256 mg/l. Tyto výsledky tak ukazují, že sco0636 udílí vysokou rezistenci k tiamulinu, a proto byl tento gen pojmenován jako *tiaA*.

Taktéž u CLI byly pozorovány patrné změny. Opět při porovnání divokého kmene s prázdným vektorem a delečních mutant, došlo ke snížení MIC. U divokého kmene s prázdným vektorem byla MIC 16-32 mg/l a u delečních mutant 8-16 mg/l. Při porovnání MIC u konstitutivní exprese genu *sco0636* (*tiaA*) v divokém kmeni a v delečních mutantách, došlo k zvýšení MIC vůči divokému kmeni a to na 256 mg/l. Zvýšení rezistence je také vidět u druhého testovaného kmene *Streptomyces coelicolor* M1154. U konstitutivní exprese *sco0636* (M1154+ermEpsco0636) byla MIC 8 mg/l a u citlivého kmene s prázdným vektorem (M1154+pIJ10257) byla 2 mg/l.

Nepatrné změny byly pozorovány při testování LIN. MIC divokého kmene s prázdným vektorem (M145+pIJ10257) byla 32 mg/l, u delečních mutant (M145 $\Delta$ 0636) byla MIC 8 mg/l. Konstitutivní exprese v divokém kmeni (M145+ermEpsco0636) a v delečních mutantách (M145 $\Delta$ 0636+ermEpsco0636) způsobila návrat na původní hodnotu 32 mg/l, oproti MIC delečních mutant.

Při testování MIC ke KAN došlo k opačnému vlivu delece inaktivovaného genu. MIC se u delečních mutant zvýšila proti MIC divokého kmene s prázdným vektorem a to z 0,125 mg/l na 1 mg/l. Tento efekt, ale pravděpodobně pomohl vzniknout zkřížením rezistence mezi KAN a APRA, což je selekční marker nesoucí rezistenční kazeta 773, která byla použita pro inaktivaci genu *tiaA*.

U zbylých testovaných antibiotik byly pozorovány jen malé změny. U TET nebyl patrný rozdíl při porovnání divokého kmene s prázdným vektorem a delečních mutant. Při porovnání divokého kmene s prázdným vektorem a konstitutivní exprese *sco0636* (*tiaA*) došlo ke změně MIC z 64 mg/l na 128 mg/l. Stejný výsledek byl také u ERY. Při porovnání delečních mutant a divokého kmene s prázdným vektorem nedošlo ke změně MIC. U porovnání divokého kmene s prázdným vektorem a konstitutivní exprese došlo k navýšení MIC z 16 mg/l na 32 mg/l nebo na hodnotu 64 mg/l. Ke změně MIC u TET a ERY nedošlo ani u druhého testovaného kmene *Streptomyces coelicolor* M1154. U PIA došlo ke snížení MIC pouze u jedné z testovaných delečních mutant, MIC u divokého kmene s prázdným vektorem byla 32 mg/l a u deleční mutanty č. 3 byla MIC 16 mg/l. U CMN a také u PIIA nebyl žádný rozdíl při stanovení MIC. U PIIA ale nebyla MIC stanovena přesně, a to kvůli špatné rozpustnosti antibiotika při vyšších koncentracích než 64 mg/l. Nicméně zhoršený růst delečních mutant na testovacích plotnách oproti zbylým testovaným kmenům, byl mírně vidět již na koncentraci

32 mg/l. Změna MIC o jednu koncentraci není významná, tato změna byla zřejmě způsobena chybou měření.

U některých z antibiotik (LIN, KAN) byla zjištěna jiná MIC u jedné z delečních mutant [M145Δ0636 (1)]. Proto byla tato deleční mutanta hodnocena s opatrností a byl brán v potaz možný fakt, že rezistenční kazeta nebyla správně inzertována a delecí genu *sco0636* (*tiaA*) mohlo dojít k dalším modifikacím v genomu.

Kmen <i>Streptomyces coelicolor</i>	MIC mg/l								
	TIA	CLI	LIN	ERY	TET	PIA	PIIA	CMN	KAN
M145+pIJ10257	> 256	16-32	32	16	64	32	> 64	64	0,125
M145+ermEpsco0636	> 256	256	32	32	128	32	> 64	64	0,125
M145+ermEplmrC	> 256	64	128	32	64	32	> 64	64	0,125
M145Δ0636 (1)	0,25	8-16	16	16	64	32	> 64	64	0,25
M145Δ0636 (2)	0,25	8-16	8	16	64	32	> 64	64	1
M145Δ0636 (3)	0,25	8-16	8	16	64	16	> 64	64	1
M145Δ0636 (1) +ermEpsco0636	> 256	256	32	32	128	16	> 64	64	0,125
M145Δ0636 (2) +ermEpsco0636	> 256	256	32	64	128	32	> 64	64	0,5
M145Δ0636 (3) +ermEpsco0636	> 256	256	32	64	128	32	> 64	64	0,5
M1154+pIJ10257	> 256	2	4	8	16	16	> 64	32	0,25
M1154+ermEpsco 0636	> 256	8	4	8	16	8	> 64	32	0,125

Tabulka 20: Výsledky stanovení MIC













































## 7.5 Sledování produkce aktinorodinu

V roce 2015 bylo publikováno (Imai *et al.*, 2015), že linkomycin v subinhibiční koncentraci indukuje produkci sekundárních metabolitů u *Streptomyces species*. Nabídla se otázka, zda k této indukci dochází pouze vlivem antibiotika nebo také vlivem ABC-F proteinu.

### 7.5.1 Testování vlivu ABC-F proteinu Sco0636 a Lmr(C) na produkci aktinorodinu

Tab. 21 ukazuje vliv ABC-F proteinu na produkci aktinorodinu. Vidíme, že dochází ke zpomalení produkce u konstitutivní exprese (M145+ermEpsco0636) a také u deleční mutanty [M145Δsco0636 (2)] vůči divokému kmeni s prázdným vektorem (M145+pIJ10257).

Konstitutivní exprese *lmr(C)* (M145+ermEplmrC) naopak produkci modrého pigmentu mírně urychlila. Protein Lmr(C) tak jako jediný z testovaných produkci aktinorodinu urychluje.

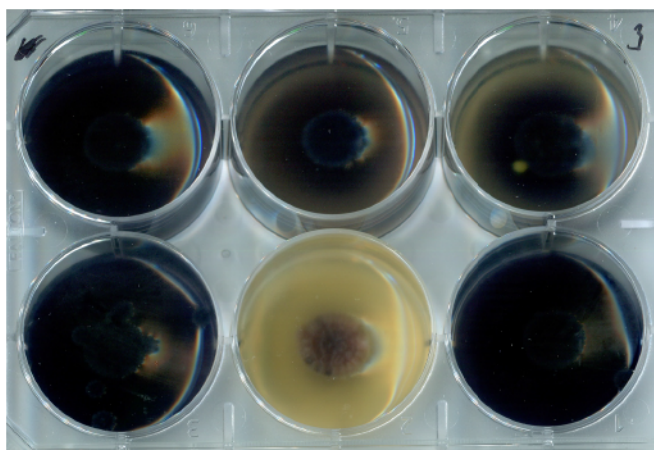
Bez antibiotika	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	12d	14d
M145+pIJ10257											
M145+ermEplmrC											
M145+ermEpsc0636											
M145Δsco0636 (2)											

Tabulka 21 Sledování produkce aktinorodinu bez indukce antibiotika

### 7.5.2 Testování vlivu subinhibiční koncentrace antibiotika na produkci aktinorodinu

Při této metodě byla využita destička o 6 jamkách (Obr. 24), aby došlo k potlačení vlivu quorum sensing, což je mezibuněčná komunikace založená na produkci, detekci a odpovědi na signální molekuly (Ng & Bassler 2009). Testování produkce bylo provedeno způsobem, kdy do destičky s MH agarem obsahující antibiotikum v subinhibiční koncentraci (0,03 mg/l) byla nanесena 10 µl kapka suspenze spor testovaných kmenů o zákalu 0,5–0,6 McFarlanda. Destička byla kultivována při 30 °C 14 dní a průběžně byla sledována produkce modrého aktinorodinu. Toto testování bylo provedeno ve spolupráci s RNDr. Markétou Koběorskou Ph.D.





Obrázek 24: Ilustrační fotka kultivační destičky













































Tab. 22 ukazuje závislost produkce aktinorodinu u divokého kmene s prázdným vektorem *Streptomyces coelicolor* (M145+pIJ10257) a indukci subinhibiční koncentrací antibiotika. Dle výsledků je vidět, že na plotnách s CLI o koncentraci 0,03 mg/l dochází k produkci aktinorodinu již třetí den. Na plotnách s TIA o koncentraci 0,03 mg/l sedmý den, zatímco na plotnách bez antibiotika až devátý den.

	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	12d	14d
M145+pIJ10257 Bez ATB											
M145+pIJ10257 CLI 0,03											
M145+pIJ10257 TIA 0,03											

Tabulka 22: Sledování indukce produkce aktinorodinu













































Při indukci TIA 0,03 mg/l (Tab. 23) je již na první pohled patrné, že produkce aktinorodinu u deleční mutanty [M145 $\Delta$ sco0636 (2)] začala již na začátku sledování. Divoký kmen s prázdným vektorem (M145+pIJ10257) a konstitutivní exprese *sco0636* (M145+ermEpsco0636) se v produkci nelišily. Konstitutivní exprese *lmr(C)* (M145+ermEplmrC) produkci zrychlila jen nepatrně oproti divokému kmeni s prázdným vektorem.



TIA 0,03	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	12d	14d
M145+pIJ10257											
M145+ermEplmrC											
M145+ermEpsco0636											
M145Δsco0636 (2)											

Tabulka 23: Sledování produkce aktinorodinu při indukci tiamulinem

Při indukci subinhibiční koncentrací CLI 0,03 mg/l (Tab. 24) si lze všimnout, že deleční mutanta [M145Δsco0636 (2)], a divoký kmen s prázdným vektorem (M145+pIJ10257) se v produkci aktinorodinu nelišily. Oproti tomu u konstitutivní exprese *sco0636* (M145+ermEpsco0636) došlo opět ke zpomalení produkce modrého pigmentu. Ještě výraznější zpomalení bylo u konstitutivní exprese *lmr(C)* (M145+ermEplmrC). Dle těchto výsledků se zdá, že v přítomnosti CLI ABC-F proteiny produkci aktinorodinu utlumí.

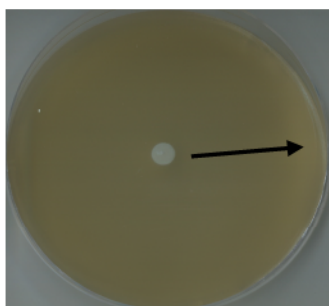
CLI 0,03	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	12d	14d
M145+pIJ10257											
M145+ermEplmrC											
M145+ermEpsco0636											
M145Δsco0636 (2)											

Tabulka 24: Sledování produkce aktinorodinu při indukci klindamycinem

### 7.5.3 Testování produkce aktinorodinu na plotnách s antibiotickými disky

Při této metodě byly na plotnu s MH agarem poklady disky TIA CLI. Difuzí antibiotika do agarů došlo k vytvoření gradientu antibiotika a koncentrace antibiotika se tak pohybovala v rozmezí subinhibiční až po inhibiční. Koncentrace antibiotika klesala ve směru

šipky uvedené na Obr. 25 a výsledky získané během tohoto sledování jsou zobrazeny v tab. 25.

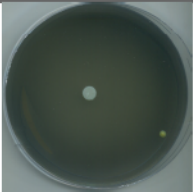
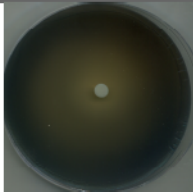
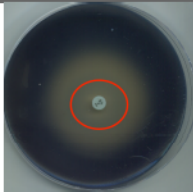
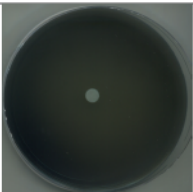
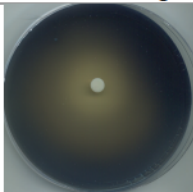
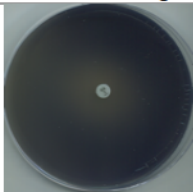
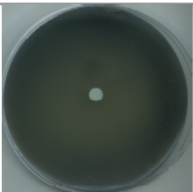
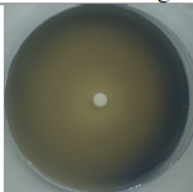
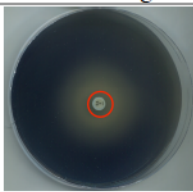
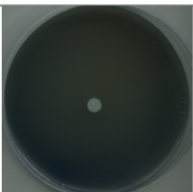
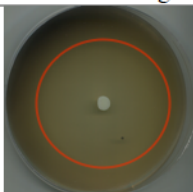
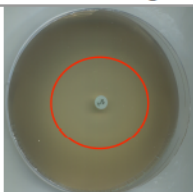


Obrázek 25: Plotna s diskem antibiotika

Bez přítomnosti antibiotika testované kmeny rostly po celé ploše MH agaru a produkce modrého aktinorodinu byla srovnatelná.

V přítomnosti TIA (koncentrace disku 0,03 mg/l) pouze u deleční mutanty dochází k inhibici růstu, ale rozdíly v produkci aktinorodinu jsou patrné u všech testovaných kmenů. U divokého kmene s prázdným vektorem *Streptomyces coelicolor* (M145+pIJ10257) bylo pozorováno nepatrné snížení produkce aktinorodinu kolem disku TIA. Kmen s konstitutivní expresí *lmr(C)* (M145+ermEplmrC) stejně jako divoký kmen s prázdným vektorem měl mírně sníženou produkci v blízkosti disku. U kmene s konstitutivní expresí *sco0636* (M145+ermEpsco0636) bylo patrnější snížení produkce aktinorodinu. Vybraná deleční mutanta [M145Δ*sco0636*(2)] měla výraznou inhibiční zónu kolem disku TIA, což ovlivnilo produkci aktinorodinu.

V přítomnosti CLI (koncentrace disku 0,002 mg/l) byly pozorovány změny v růstu kmenů, ale především v produkci aktinorodinu. Divoký kmen s prázdným vektorem (M145+pIJ10257) měl malou inhibiční zónu okolo disku a produkce aktinorodinu byla jasně snížena kolem vytvořené inhibiční zóny. Kmen s konstitutivní expresí *lmr(C)* (M145+ermEplmrC) neměl kolem disku vytvořenou inhibiční zónu a ovlivnění produkce aktinorodinu bylo jen velmi mírné. Kmen s konstitutivní expresí *sco0636* (M145+ermEpsco0636) měl velmi nepatrnou inhibiční zónu a produkce aktinorodinu byla v těsné blízkosti této zóny snížena. Růst deleční mutanty byl značně inhibován, což opět výrazně ovlivnilo produkci aktinorodinu.

	Bez antibiotika	TIA 0,03 mg	CLI 0,002 mg
M145+pIJ10257		 MIC > 256 mg/l	 MIC 16-32 mg/l
M145+ermEplmrC		 MIC > 256 mg/l	 MIC 64 mg/l
M145+ermEpsco0636		 MIC > 256 mg/l	 MIC 256 mg/l
M145Δ0636 (2)		 MIC 0,25 mg/l	 MIC 8-16 mg/l

Tabulka 25: Sledování produkce aktinorodinu na plotnách s antibiotickými disky (8. den). Červeně označená inhibiční zóna

## 8 Diskuze

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací ARE ABC-F proteinu Sco0636 (TiaA) a hlavním cílem bylo připravit deleční mutantu genu *sco0636* (*tiaA*), jenž je nejbližším homologním genem *lmr(C)* u *Streptomyces coelicolor* (Obr. 17), a sledovat změny v rezistenčním fenotypu a produkci aktinorodinu.

Analýza četnosti ABC-F proteinů ukazuje, že u producentů antibiotik je výrazně vyšší počet ABC-F proteinů než u patogenních organismů. Nacházíme zde jednak ABC-F proteiny, které jsou kódovány geny lokalizovanými v klastrech pro biosyntézu antibiotik a jednak jejich blízké homology, jejichž geny se v genomu nachází samostatně (nejsou součástí známých biosyntetických klastrů). Jejich úloha je tak rezistenční, ale může být zřejmě i regulační. A navíc ze struktury těchto proteinů víme, že jejich doména rameno je srovnatelně dlouhá jako u translačního faktoru EttA, který má regulační funkci. U ABC-F proteinů u patogenních organismů je tato doména kratší nebo chybí úplně. Ale naopak u patogenních organismů je delší doména linker, jejíž aminokyselinové složení udává antibiotickou specifitu. Úlohou ABC-F proteinů u patogenních organismů je tak spíš udílení rezistence.

Během testování MIC bylo zjištěno, že jedna ze tří nezávislých delečních mutant dosahuje jiných MIC než zbylé dvě. Při testování MIC k LIN byly stanoveny hodnoty 16 mg/l a 8 mg/l, tento rozdíl se však dá přisoudit chybě měření. Nicméně při stanovení MIC u KAN, byl tento rozdíl mnohem patrnější. MIC u dvou delečních mutant byla 1 mg/l a třetí mutant měla MIC 0,25 mg/l. Tento rozdíl mohl být zřejmě způsobený nesprávnou homologní rekombinací modifikovaného kosmidu. Během realizace této diplomové práce se, ale nepodařilo pomocí PCR reakce ověřit správnost rekombinace a pro využití přesnější metody Southern blot se opakovaně nepodařilo získat dostatečné množství DNA. Proto při hodnocení výsledků získaných u této deleční mutanty bylo přihlíženo k možnosti ovlivnění stanovení MIC.

Z výsledků stanovení MIC k vybraným antibiotikům vyplývá, že Sco0636 (TiaA) udílí vysokou rezistenci k TIA a nízkou rezistenci k LIN a CLI. Očekávali jsme, že protein Sco0636 bude mít stejnou antibiotickou specifitu jako Lmr(C). Dle výsledků je ale specifita u Sco0636 posunuta více k TIA. Navíc konstitutivní exprese *sco0636* (*tiaA*) udílí vyšší rezistenci ke CLI než konstitutivní exprese *lmr(C)*.

Sledování produkce aktinorodinu bylo provedeno ve dvou různých situacích: sledování produkce na kultivační destičce a na plotnách s antibiotickým diskem. Při sledování produkce



na destičce bylo zabráněno vlivu quorum sensing a médium destičky obsahovalo konstantní subinhibiční koncentraci CLI a TIA.

Na destičce bez antibiotika, za situace, kdy pozorujeme pouze vliv ABC-F proteinů, je patrné, že protein Lmr(C) indukuje produkci aktinorodinu, zatímco Sco0636 produkci tlumí.

Další výsledky testování produkce aktinorodinu potvrdily, že subinhibiční koncentrace linkosamidů indukuje produkci aktinorodinu u *Streptomyces coelicolor*, jak se zmínili již Imai (2015) a Ishizuka (2018) ve svých studiích. Navíc z nových dosud nepublikovaných výsledků projektu naší laboratoře zabývajícího se studiem ARE ABC-F proteinů, vyplývá, že exprese genu *lmr(C)* se výrazně zvyšuje po přidání CLI. Zvýšená exprese *lmr(C)* spouští expresi *lmbU*, který kóduje hlavní regulátor biosyntézy linkomycinu a postupně spouští aktivaci genů tohoto biosyntetického klastru (Hou *et al.*, 2018). Nabízí se otázka, zda protein Sco0636 přímo ovlivňuje hlavní aktivátor produkce aktinorodinu ActII-ORF4 (popsán v kapitole 5.1) nebo se účastní podobně složité regulační kaskády jako Lmr(C).

Dále bylo testováno, zda konstitutivní exprese genů pro ABC-F proteiny Lmr(C) a Sco0636 (TiaA) má vliv na produkci aktinorodinu. Zda tedy nedochází k aktivaci sekundárního metabolismu po přidání antibiotik pomocí ABC-F proteinů. Při indukci subinhibiční koncentrací TIA (0,03 mg/l, MIC > 256 mg/l) přítomnost ABC-F proteinu neměla vliv na produkci aktinorodinu. Naopak delece genů kódující Sco0636 (TiaA) produkci rapidně urychlila. Při indukci subinhibiční koncentrací CLI (0,03 mg/l, MIC 16-32 mg/l) Sco0636 (TiaA) zpomaluje produkci aktinorodinu a Lmr(C) má tento efekt ještě vyšší. Zpožděná produkce aktinorodinu vlivem působení ARE proteinů v přítomnosti antibiotika je pravděpodobně způsobena udílením rezistence: Lmr(C) udílí rezistenci ke CLI, antibiotikum se nemůže vázat na ribozom a jeho regulace je tím potlačena. Stejný efekt platí i u Sco0636 (TiaA).

Při sledování produkce aktinorodinu na plotnách s diskem došlo k vytvoření gradientu antibiotika. Koncentrace tak dosahovala hodnot od inhibiční až po subinhibiční a setkaly se zde dva různé efekty: inhibice růstu a indukce produkce sekundárního metabolismu. Očekávali jsme vytvoření dvou zón: inhibiční a zóny odpovídající produkci aktinorodinu. Deleční mutantu genu *sco0636* [M145Δ*sco0636*(2), MIC k TIA 0,25 mg/l, CLI 8-16 mg/l] byla výrazně inhibována v růstu jak při indukci TIA, tak CLI, což značně snížilo produkci aktinorodinu. Naopak konstitutivní exprese *lmr(C)* udílenou rezistencí [MIC k TIA > 256 mg/l, CLI 64 mg/l] zabránila inhibici růstu a umožnila produkci. Dle výsledků jsme pozorovali efekt, který byl dán závislostí mezi udílením rezistence a indukci



produkce aktinorodinu. Z toho vyplývá, že čím vyšší koncentrace antibiotika, tím vyšší rezistenci ABC-F protein musel udílet, aby kmen mohl růst a produkovat.

Pozorovaný vliv antibiotik na produkci aktinorodinu ukazuje, že při nižší koncentraci ABC-F protein tlumí produkci a při vyšší koncentraci naopak indukuje. Podobný koncept se odráží ve fenoménu jménem hormeze. Tento termín se používá při popisu biologických reakcí na signály nebo podmínky z okolního prostředí, které mají dvojfázový vztah dávky a odpovědi. Při nízkých koncentracích nebo dávkách dochází ke stimulaci a při vysokých dochází naopak k inhibici (Calabrese & Baldwin 2002).

Očekávali jsme, že Sco0636 bude ve své funkci podobný proteinu Lmr(C). Protein Sco0636 má jinou antibiotickou specifitu a je zřejmě především rezistenčním proteinem. Naopak protein Lmr(C) je dle výsledků nejen rezistenční protein, ale i regulačním. Pro získání dalších výsledků, které by mohly tyto zjištění doplnit, by se nabízela možnost mezidruhovou konjugací vnést konstitutivní expresi *lmr(C)* do deleční mutanty *sco0636* (*tia4*) a konstitutivní expresi *sco0636* do deleční mutanty *lmr(C)* v *Streptomyces lincolnensis*. Opět stanovit MIC k vybraným antibiotikům a sledovat ovlivnění produkce aktinorodinu. Také by bylo možné provést proteomovou analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie a zjistit změny exprese vybraných ABC-F proteinů. Tato metoda by také mohla pomoci, při studiu jednotlivých ABC-F proteinů, protože jak již bylo zmíněno u rodu *Streptomyces* se nachází více ABC-F proteinů společně. A není možné zabránit vlivu jiných ABC-F proteinů inaktivací pouze jednoho z nich. Při jejich studiu je tedy zapotřebí připravit delecí více nebo všech ABC-F proteinů a postupně sledovat vliv jednotlivých delecí na produkci sekundárních metabolitů a stanovení MIC.

## 9 Souhrn

- Podařily se připravit tři nezávislé deleční mutanty genu *sco0636 (tiaA)* ve *Streptomyces coelicolor* M145. U jedné z nich, ale zřejmě došlo k nesprávné homologní rekombinaci.
- Úspěšně se podařilo připravit dva nezávislé konstrukty pro konstitutivní expresi genu *sco0636 (tiaA)* a mezidruhovou konjugací vložit do divokého kmene *Streptomyces coelicolor* M145, do citlivého kmene *Streptomyces coelicolor* M1154 a do připravených delečních mutant.
- U všech takto připravených kmenů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace a pro porovnání byl ještě otestován kmen *Streptomyces coelicolor* M145 s konstitutivní expresí *lmr(C)*.
- Pro sledování produkce aktinorodinu byly použity téměř všechny připravené kmeny. Pouze u delečních mutant byla pro testování produkce aktinorodinu vybrána jen jedna z nich.
- Delece genu *sco0636 (tiaA)* výrazně ovlivnila MIC u TIA, částečně u LIN a CLI, u kterého navíc došlo ke zvýšení MIC u konstitutivní exprese *tiaA*.
- Delece a konstitutivní exprese *sco0636 (tiaA)* ovlivnila produkci aktinorodinu

## 10 Seznam použité literatury

1. ABASS, Ala S. a Clive EDWARDS. Effects of Metals on *Streptomyces coelicolor* Growth and Actinorhodin Production. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1990, **56**(3), 675-680 [cit. 2018-08-07]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/56/3/675.short>
2. AMINOV, Rustam I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* [online]. 2009, **11**(12), 2970-2988 [cit. 2018-08-08]. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x. ISSN 14622912. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>
3. ARENZ, Stefan a Daniel N. WILSON. Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. *Molecular Cell* [online]. 2016, **61**(1), 3-14 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.019. ISSN 10972765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515008102>
4. BAN, N. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* [online]. **289**(5481), 905-920 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1126/science.289.5481.905. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.289.5481.905>
5. BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
6. BENTLEY, S. D., K. F. CHATER, A.-M. CERDEÑO-TÁRRAGA, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* [online]. 2002, **417**(6885), 141-147 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/417141a. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/417141a>
7. BOËL, Grégory, Paul C SMITH, Wei NING, et al. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2014, **21**(2), 143-151 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/nsmb.2740. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nsmb.2740>
8. BORIĆ, Maja, Tjaša DANEVČIČ a David STOPAR. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; A New UV-Protective Pigment. *Microbial Ecology* [online]. 2011, **62**(3), 528-536 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s00248-011-9857-0. ISSN 0095-3628. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-011-9857-0>
9. BORST, P. a R. Oude ELFERINK. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2002, **71**(1), 537-592 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>
10. CALABRESE, E J a L A BALDWIN. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* [online]. 2016, **21**(2), 91-97 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1191/0960327102ht217oa. ISSN 0960-3271. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327102ht217oa>

11. CERDEÑO, Ana M., Mervyn J. BIBB a Gregory L. CHALLIS. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology* [online]. 2001, **8**(8), 817-829 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S1074-5521(01)00054-0. ISSN 10745521. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552101000540>
12. CRANEY, Arryn, Salman AHMED a Justin NODWELL. Towards a new science of secondary metabolism. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2013, **66**(7), 387-400 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/ja.2013.25. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ja201325>
13. DASSA, Elie a Philippe BOUIGE. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology* [online]. 2001, **152**(3-4), 211-229 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0923-2508(01)01194-9. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250801011949>
14. DAVIDOVICH, C., A. BASHAN, T. AUERBACH-NEVO, R. D. YAGGIE, R. R. GONTAREK a A. YONATH. Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(11), 4291-4296 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1073/pnas.0700041104. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700041104>
15. DAVIDSON, A. L., E. DASSA, C. ORELLE a J. CHEN. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2008, **72**(2), 317-364 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/MMBR.00031-07. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00031-07>
16. FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, L. T., R. DEL SOL, M. C. EVANS, S. FIELDING, P. R. HERRON, G. CHANDRA a P. J. DYSON. A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2011, **99**(3), 515-522 [cit. 2018-08-11]. DOI: 10.1007/s10482-010-9518-1. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-010-9518-1>
17. FLÄRDH, Klas a Mark J. BUTTNER. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2009, **7**(1), 36-49 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/nrmicro1968. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1968>
18. GOMEZ-ESCRIBANO, Juan Pablo a Mervyn J. BIBB. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology* [online]. 2011, **4**(2), 207-215 [cit. 2018-08-09]. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x. ISSN 17517915. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x>
19. GREEN AND, Rachel a Harry F. NOLLER. RIBOSOMES AND TRANSLATION. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1997, **66**(1), 679-716 [cit. 2018-08-07]. DOI:



- 10.1146/annurev.biochem.66.1.679. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.66.1.679>
20. GUST, B., G. L. CHALLIS, K. FOWLER, T. KIESER a K. F. CHATER. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, **100**(4), 1541-1546 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1073/pnas.0337542100. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0337542100>
  21. HANEKAMP, Jaap C. a Aalt BAST. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, **39**(1), 213-220 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.etap.2014.11.016. ISSN 13826689. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668914002865>
  22. HANEKOP, N., J. ZAITSEVA, S. JENEWEIN, I.B. HOLLAND a L. SCHMITT. Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Letters* [online]. 2006, **580**(4), 1036-1041 [cit. 2018-08-09]. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.11.012. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2005.11.012>
  23. HANSEN, Jeffrey L., Peter B. MOORE a Thomas A. STEITZ. Structures of Five Antibiotics Bound at the Peptidyl Transferase Center of the Large Ribosomal Subunit. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2003, **330**(5), 1061-1075 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00668-5. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603006685>
  24. HOLLAND, I.Barry a Mark A. BLIGHT. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1999, **293**(2), 381-399 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2993. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283699929935>
  25. HONG, Hee-Jeon, Matthew I. HUTCHINGS, Lionel M. HILL a Mark J. BUTTNER. The Role of the Novel Fem Protein VanK in Vancomycin Resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(13), 13055-13061 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1074/jbc.M413801200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M413801200>
  26. HOT, Chloé, Nicolas BERTHET a Olivier CHESNEAU. Characterization of sal (A), a Novel Gene Responsible for Lincosamide and Streptogramin A Resistance in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014, **58**(6), 3335-3341 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/AAC.02797-13. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02797-13>
  27. HOU, Bingbing, Yanwei LIN, Haizhen WU, et al. The Novel Transcriptional Regulator LmbU Promotes Lincomycin Biosynthesis through Regulating Expression of Its Target Genes in *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Bacteriology* [online]. 2017, **200**(2), - [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/JB.00447-17. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.00447-17>



28. HUANG, Jianqiang, Jing SHI, Virginie MOLLE, et al. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* [online]. 2005, **58**(5), 1276-1287 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04879.x. ISSN 0950382X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2005.04879.x>
29. CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2006, **361**(1469), 761-768 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1098/rstb.2005.1758. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2005.1758>
30. CHEN, Bo, Grégory BOËL, Yaser HASHEM, et al. EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2014, **21**(2), 152-159 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/nsmb.2741. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nsmb.2741>
31. CHIEN, J. W., M. L. KUCIA a R. A. SALATA. Use of Linezolid, an Oxazolidinone, in the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2000, **30**(1), 146-151 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1086/313597. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/313597>
32. IMAI, Yu, Seizo SATO, Yukinori TANAKA, Kozo OCHI, Takeshi HOSAKA a H. NOJIRI. Lincomycin at Subinhibitory Concentrations Potentiates Secondary Metabolite Production by *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2015, **81**(11), 3869-3879 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/AEM.04214-14. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.04214-14>
33. IQBAL, Mudassar, Yvonne MAST, Rafat AMIN, David A. HODGSON, Wolfgang WOHLLEBEN a Nigel J. BURROUGHS. Extracting regulator activity profiles by integration of de novo motifs and expression data: characterizing key regulators of nutrient depletion responses in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, **40**(12), 5227-5239 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1093/nar/gks205. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks205>
34. ISHIZUKA, Misaki, Yu IMAI, Keiichiro MUKAI, Kazuma SHIMONO, Ryoko HAMAUZU, Kozo OCHI a Takeshi HOSAKA. A possible mechanism for lincomycin induction of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2018, **111**(5), 705-716 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s10482-018-1021-0. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-018-1021-0>
35. ISLAM, K. M. S., U. KLEIN a D. G. S. BURCH. The activity and compatibility of the antibiotic tiamulin with other drugs in poultry medicine--A review. *Poultry Science* [online]. 2009, **88**(11), 2353-2359 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.3382/ps.2009-00257. ISSN 0032-5791. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.3382/ps.2009-00257>

36. JOHNSTON, Nicole, Tariq MUKHTAR a Gerard WRIGHT. Streptogramin Antibiotics: Mode of Action and Resistance. *Current Drug Targets* [online]. 2002, **3**(4), 335-344 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.2174/1389450023347678. ISSN 13894501. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-4501&volume=3&issue=4&spage=335>
37. JULÁK, Jaroslav. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0750-6.
38. KACZANOWSKA, M. a M. RYDEN-AULIN. Ribosome Biogenesis and the Translation Process in Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007, **71**(3), 477-494 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/MMBR.00013-07. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00013-07>
39. KANNAN, Krishna a Alexander S. MANKIN. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2011, **1241**(1), 33-47 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x. ISSN 00778923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x>
40. KIEL, Michael C., V. Samuel RAJ, Hideko KAJI a Akira KAJI. Release of Ribosome-bound Ribosome Recycling Factor by Elongation Factor G. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(48), 48041-48050 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1074/jbc.M304834200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M304834200>
41. KISSELEV, L. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Termination of translation. *The EMBO Journal* [online]. **22**(2), 175-182 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1093/emboj/cdg017. ISSN 14602075. Dostupné z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdg017>
42. KOBĚRSKÁ, M., J. KOPECKÝ, J. OLŠOVSKÁ, M. JELÍNKOVÁ, D. ULANOVA, P. MAN, M. FLIEGER a J. JANATA. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain Streptomyces lincolnensis ATCC 25466. *Folia Microbiologica* [online]. 2008, **53**(5), 395-401 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s12223-008-0060-8. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-008-0060-8>
43. LAURSEN, B. S., H. P. SORENSSEN, K. K. MORTENSEN a H. U. SPERLING-PETERSEN. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2005, **69**(1), 101-123 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005>
44. LELL, B. a P. G. KREMSNER. Clindamycin as an Antimalarial Drug: Review of Clinical Trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002, **46**(8), 2315-2320 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2315-2320.2002. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.8.2315-2320.2002>
45. LENART, Jakub, Vladimír VIMBERG, Ludmila VESELA, Jiri JANATA a Gabriela BALIKOVA NOVOTNA. Detailed Mutational Analysis of Vga(A) Interdomain Linker: Implication for Antibiotic Resistance Specificity and Mechanism. *Antimicrobial Agents*



- and Chemotherapy* [online]. 2015, **59**(2), 1360-1364 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/AAC.04468-14. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.04468-14>
46. LI, Fuhou, Jingdan LIANG, Weixia WANG, Xiufen ZHOU, Zixin DENG a Zhijun WANG. Analysis of *Streptomyces coelicolor* membrane proteome using two-dimensional native/native and native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* [online]. 2014, **465**, 148-155 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.ab.2014.08.009. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326971400342X>
  47. LICHT, Anke a Erwin SCHNEIDER. ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Open Life Sciences* [online]. 2011, **6**(5), - [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.2478/s11535-011-0054-4. ISSN 2391-5412. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/biol.2011.6.issue-5/s11535-011-0054-4/s11535-011-0054-4.xml>
  48. LIU, G., K. F. CHATER, G. CHANDRA, G. NIU a H. TAN. Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2013, **77**(1), 112-143 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/MMBR.00054-12. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00054-12>
  49. MAST, Yvonne a Wolfgang WOHLLEBEN. Streptogramins – Two are better than one!. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2014, **304**(1), 44-50 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.08.008. ISSN 14384221. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S143842211300132X>
  50. MÉNDEZ, Carmen a José A SALAS. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology* [online]. 2001, **152**(3-4), 341-350 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0923-2508(01)01205-0. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250801012050>
  51. MOLDAY, Robert S., Ming ZHONG a Faraz QUAZI. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2009, **1791**(7), 573-583 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.bbalip.2009.02.004. ISSN 13881981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198109000444>
  52. MURINA, Victoriia, Marje KASARI, Michael REITH, Vasili HAURYLIUK a Gemma ATKINSON. *ABCF ATPases involved in protein synthesis, ribosome assembly and antibiotic resistance: structural and functional diversification across the tree of life* [online]. 2017, , - [cit. 2018-08-07]. DOI: <https://doi.org/10.1101/220046>. Dostupné z: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/11/16/220046>
  53. MURINA, Victoriia, Marje KASARI, Vasili HAURYLIUK a Gemma C ATKINSON. Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Research* [online]. 2018, **46**(7), 3753-3763 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1093/nar/gky050. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/46/7/3753/4838057>

54. NG, Wai-Leung a Bonnie L. BASSLER. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics* [online]. 2009, **43**(1), 197-222 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134304. ISSN 0066-4197. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
55. NIESELT, Kay, Florian BATTKE, Alexander HERBIG, et al. The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* [online]. 2010, **11**(1), 10- [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1186/1471-2164-11-10. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-10>
56. OHNISHI, Yasuo, Haruka YAMAZAKI, Jun-ya KATO, Ayami TOMONO a Sueharu HORINOUCI. AdpA, a Central Transcriptional Regulator in the A-Factor Regulatory Cascade That Leads to Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2014, **69**(3), 431-439 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1271/bbb.69.431. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.69.431>
57. OHNISHI, Y., J. ISHIKAWA, H. HARA, et al. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology* [online]. 2008, **190**(11), 4050-4060 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/JB.00204-08. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00204-08>
58. OSWALD, Christine, I. Barry HOLLAND a Lutz SCHMITT. The motor domains of ABC-transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [online]. 2006, **372**(6), 385-399 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s00210-005-0031-4. ISSN 0028-1298. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00210-005-0031-4>
59. PARISH, L.C. a J.L. PARISH. Retapamulin: A new topical antibiotic for the treatment of uncomplicated skin infections. *Drugs of Today* [online]. 2008, **44**(2), 91- [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1358/dot.2008.44.2.1153446. ISSN 1699-3993. Dostupné z: [http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk\\_journals.xml\\_summary\\_pr?p\\_JournalId=4&p\\_RefId=1153446&p\\_IsPs=N](http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=4&p_RefId=1153446&p_IsPs=N)
60. PÉREZ-TOMÁS, Ricardo, Beatriz MONTANER, Esther LLAGOSTERA a Vanessa SOTO-CERRATO. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2003, **66**(8), 1447-1452 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0006-2952(03)00496-9. ISSN 00062952. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295203004969>
61. POULSEN, Susan M., Märít KARLSSON, Lena B. JOHANSSON a Birte VESTER. The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Molecular Microbiology* [online]. 2001, **41**(5), 1091-1099 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02595.x. ISSN 0950382X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02595.x>
62. POULSEN, Susan M, Christine KOFOED a Birte VESTER. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2000, **304**(3), 471-481 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4229. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283600942293>



63. RAMOS, J. L., M. MARTINEZ-BUENO, A. J. MOLINA-HENARES, et al. The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2005, **69**(2), 326-356 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005>
64. REICHHELD, Sean E., Zhou YU a Alan R. DAVIDSON. The induction of folding cooperativity by ligand binding drives the allosteric response of tetracycline repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(52), 22263-22268 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1073/pnas.0911566106. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0911566106>
65. REYNOLDS, Elinor D. a Jonathan H. COVE. Resistance to telithromycin is conferred by msr(A), msrC and msr(D) in Staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2005, **56**(6), 1179-1180 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1093/jac/dki378. ISSN 1460-2091. Dostupné z: <http://academic.oup.com/jac/article/56/6/1179/753002/Resistance-to-telithromycin-is-conferred-by-msrA>
66. RØNNEST, Nanna Petersen, Stuart M. STOCKS, Anna ELIASSON LANTZ a Krist V. GERNAEY. Introducing process analytical technology (PAT) in filamentous cultivation process development: comparison of advanced online sensors for biomass measurement. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2011, **38**(10), 1679-1690 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s10295-011-0957-0. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-0957-0>
67. SERGIEV, P. V. Function of the ribosomal E-site: a mutagenesis study. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(18), 6048-6056 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1093/nar/gki910. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki910>
68. SHARKEY, Liam K. R., Thomas A. EDWARDS a Alex J. O'NEILL. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *MBio* [online]. 2016, **7**(2), - [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/mBio.01975-15. ISSN 2150-7511. Dostupné z: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01975-15>
69. SHI, Xinying, Prashant K. KHADE, Karissa Y. SANBONMATSU a Simpson JOSEPH. Functional Role of the Sarcin–Ricin Loop of the 23S rRNA in the Elongation Cycle of Protein Synthesis. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2012, **419**(3-4), 125-138 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.03.016. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283612002719>
70. SILVERTON, Latoya, Michael DEAN a Karobi MOITRA. Variation and evolution of the ABC transporter genes ABCB1, ABCC1, ABCG2, ABCG5 and ABCG8: implication for pharmacogenetics and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions* [online]. 2011, **26**(4), - [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1515/DMDI.2011.027. ISSN 2191-0162. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/dmdi.2011.26.issue-4/dmdi.2011.027/dmdi.2011.027.xml>
71. SINGH, Harcharan, Meena ATRAY a Pankaj Kumar MODI. ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY PATTERN OF METHICILLIN RESISTANCE



- STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN TERTIARY CARE CENTER AT SOUTHERN RAJASTHAN. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. 2014, **5**(2), - [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(2).607-11. ISSN 23205148. Dostupné z: <http://ijpsr.com/bft-article/antibiotic-susceptibility-pattern-of-methicillin-resistance-staphylococcus-aureus-in-tertiary-care-center-at-southern-rajasthan/?view=fulltext>
72. SPIRIN, Alexander S. Ribosome as a molecular machine. *FEBS Letters* [online]. 2002, **514**(1), 2-10 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02309-8. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2802%2902309-8>
  73. SPÍŽEK, Jaroslav a Tomáš ŘEZANKA. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2017, **133**, 20-28 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.12.001. ISSN 00062952. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295216304622>
  74. STAGG, Scott M., Jason A. MEARS a Stephen C. HARVEY. A Structural Model for the Assembly of the 30S Subunit of the Ribosome. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2003, **328**(1), 49-61 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00174-8. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603001748>
  75. STANKOVIC, Nada, Vanja RADULOVIC, Milos PETKOVIC, Ivan VUCKOVIC, Milka JADRANIN, Branka VASILJEVIC a Jasmina NIKODINOVIC-RUNIC. Streptomyces sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, **96**(5), 1217-1231 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s00253-012-4237-3. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4237-3>
  76. STARIČ, Nejc, Tjaša DANEVČIČ a David STOPAR. Vibrio sp. DSM 14379 Pigment Production—A Competitive Advantage in the Environment?. *Microbial Ecology* [online]. 2010, **60**(3), 592-598 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1007/s00248-010-9671-0. ISSN 0095-3628. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-010-9671-0>
  77. STEITZ, Thomas A a Peter B MOORE. RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2003, **28**(8), 411-418 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00169-5. ISSN 09680004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000403001695>
  78. SZEWCZAK, A.A. a P.B. MOORE. The Sarcin/Ricin Loop, a Modular RNA. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1995, **247**(1), 81-98 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1006/jmbi.1994.0124. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283684701240>
  79. TAHLAN, Kapil, Sang Kyun AHN, Anson SING, Tetyana D. BODNARUK, Andrew R. WILLEMS, Alan R. DAVIDSON a Justin R. NODWELL. Initiation of actinorhodin export in Streptomyces coelicolor. *Molecular Microbiology* [online]. 2007, **63**(4), 951-961 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05559.x. ISSN 0950382X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05559.x>

80. TER BEEK, Josy, Albert GUSKOV a Dirk Jan SLOTBOOM. Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology* [online]. 2014, **143**(4), 419-435 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1085/jgp.201411164. ISSN 0022-1295. Dostupné z: <http://www.jgp.org/lookup/doi/10.1085/jgp.201411164>
81. TESSÉ, Sophie, François TRUEBA, Nicolas BERTHET, Chloé HOT a Olivier CHESNEAU. Resistance Genes Underlying the LS A Phenotype of Staphylococcal Isolates from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(9), 4543-4546 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/AAC.00259-13. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00259-13>
82. VIGAR, Justin R.J. a Hans-Joachim WIEDEN. Engineering bacterial translation initiation — Do we have all the tools we need?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2017, **1861**(11), 3060-3069 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.008. ISSN 03044165. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416517300910>
83. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
84. WANG, L., X. TIAN, J. WANG, H. YANG, K. FAN, G. XU, K. YANG a H. TAN. Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(21), 8617-8622 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1073/pnas.0900592106. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900592106>
85. WANG, Yang, Yuan LV, Jiachang CAI, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2015, **70**(8), 2182-2190 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1093/jac/dkv116. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkv116>
86. WHITE, J a M BIBB. BldA dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *Journal of Bacteriology* [online]. 1997, **179**(3), 627-633 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/jb.179.3.627-633.1997. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.179.3.627-633.1997>
87. WIEST, Donald B., Joel B. COCHRAN a Fred W. TECKLENBURG. Chloramphenicol Toxicity Revisited: A 12-Year-Old Patient With a Brain Abscess. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2012, **17**(2), 182-188 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.5863/1551-6776-17.2.182. ISSN 1551-6776. Dostupné z: <http://www.jppt.org/doi/abs/10.5863/1551-6776-17.2.182>
88. WILKENS, Stephan. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports* [online]. 2015, **7**, - [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.12703/P7-14. ISSN 20517599. Dostupné z: <http://www.f1000.com/prime/reports/b/7/14>
89. WILLIAMSON, Neil R., Peter C. FINERAN, Finian J. LEEPER a George P. C. SALMOND. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews*



- Microbiology* [online]. 2006, **4**(12), 887-899 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/nrmicro1531. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1531>
90. WILLIAMSON, Neil R, Peter C FINERAN, Tamzin GRISTWOOD, Suresh R CHAWRAI, Finian J LEEPER a George PC SALMOND. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiology* [online]. 2007, **2**(6), 605-618 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.2217/17460913.2.6.605. ISSN 1746-0913. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460913.2.6.605>
  91. WILSON, D. N., F. SCHLUENZEN, J. M. HARMS, A. L. STAROSTA, S. R. CONNELL a P. FUCINI. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(36), 13339-13344 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1073/pnas.0804276105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804276105>
  92. WIMBERLY, Brian T., Ditlev E. BRODERSEN, William M. CLEMONS, Robert J. MORGAN-WARREN, Andrew P. CARTER, Clemens VONRHEIN, Thomas HARTSCH a V. RAMAKRISHNAN. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* [online]. 2000, **407**(6802), 327-339 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/35030006. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35030006>
  93. YAMAMOTO, Hiroshi, Yan QIN, John ACHENBACH, Chengmin LI, Jaroslaw KIJEK, Christian M. T. SPAHN a Knud H. NIERHAUS. EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2014, **12**(2), 89-100 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1038/nrmicro3176. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro3176>
  94. YAN, K., L. MADDEN, A. E. CHOUDHRY, C. S. VOIGT, R. A. COPELAND a R. R. GONTAREK. Biochemical Characterization of the Interactions of the Novel Pleuromutilin Derivative Retapamulin with Bacterial Ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2006, **50**(11), 3875-3881 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1128/AAC.00184-06. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00184-06>
  95. YUSUPOVA, Gulnara Zh., Marat M. YUSUPOV, J.H.D. CATE a Harry F. NOLLER. The Path of Messenger RNA through the Ribosome. *Cell* [online]. 2001, **106**(2), 233-241 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00435-4. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867401004354>
  96. ZHANG, Hechun, Jixun ZHAN, Keman SU a Yuanxing ZHANG. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound,  $\lambda$ -actinorhodin. *Food Chemistry* [online]. 2006, **95**(2), 186-192 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.028. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605000427>
  97. ZHANG, Hui-Zhan, Heike SCHMIDT a Wolfgang PIEPERSBERG. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *ImrA* and *ImrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78?11. *Molecular Microbiology* [online]. 1992, **6**(15), 2147-

2157 [cit. 2018-08-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01388.x. ISSN 0950-382X.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01388.x>